

**EDUARDO ZANARDINI MARTINS**

**RNA DUPLA FITA EM *Phyllosticta spinarum*:  
CARACTERIZAÇÃO E CURA.**

Monografia apresentada à disciplina  
Estágio em Genética como requisito  
parcial à conclusão da modalidade de  
bacharelado do Curso de Ciências  
Biológicas do Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do  
Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Kava-  
Cordeiro.

**CURITIBA  
2005**

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Dr<sup>a</sup>. Vanessa Kava-Cordeiro, pela excelente orientação, amizade e paciência que me possibilitou alcançar mais um degrau em minha formação acadêmica.

À professora Ruth Janice Schadeck, que me possibilitou utilizar o fotomicroscópio do Departamento de Biologia Celular.

À Ariani, pela grande atenção dada no desenvolvimento do trabalho em seu laboratório.

Ao professor Marco Randi, pela ajuda na parte de informática.

Aos colegas do laboratório de Genética Molecular Humana, pela paciência quando precisei de nitrogênio líquido.

À todos meus colegas de laboratório, que sempre estiveram ao meu lado, me ajudaram a resolver problemas e tiveram uma ótima convivência dentro e fora do ambiente de trabalho.

Aos meus pais Ary e Elinice, que sempre me incentivaram e me apoiaram em todas as minhas escolhas.

Aos meus irmãos Gabriel e Rodrigo, pelo excelente convívio em casa.

Aos meus amigos do curso de Biologia: João, Elton, Raphael, César, Ana, Luciane e Júlia pelas conversas e apoio.

À Deus, que tornou possível a realização desta monografia.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS E FUNGOS FITOPATOGENICOS.....	3
2.2 O GÊNERO <i>Guignardia</i> (Viala e Ravaz) e seu anamorfo, <i>Phyllosticta</i> (Pers. ex Desm).....	7
2.3 RNA DUPLA FITA EM FUNGOS.....	10
2.4 CURA DE RNA DUPLA FITA EM FUNGOS.....	21
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 LINHAGENS UTILIZADAS.....	24
4.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS NOS MEIOS DE CULTURA.....	24
4.2.1 Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO et al., 1953).....	24
4.2.2 Meio Completo (MC) (PONTECORVO et al., 1953, modificado por AZEVEDO; COSTA, 1973).....	25
4.2.3 Meio Completo (MC) com ciclohexamida.....	25
4.2.4 Meio BDA.....	25
4.2.5 Solução de Vitaminas.....	26
4.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	26
4.3.1 Solução Salina.....	26
4.3.2 Solução de "Tween 80".....	26
4.3.3 Tampão de Extração de DNA (RAEDER; BRODA, 1985).....	26
4.3.4 Clorofil.....	27
4.3.5 Clorofane.....	27
4.3.6 Tampão TE.....	27
4.3.7 Tampão TBE 5x (solução estoque).....	27
4.3.8 Solução de Brometo de Etídio.....	28
4.3.9 Tampão de corrida ("gel loading buffer").....	28

4.3.10 Solução EDTA 0,5 M pH 8,0 (estoque).....	28
4.3.11 Solução Tris-HCl 1 M pH 8,0 (estoque).....	28
4.3.12 Solução de Ciclohexamida (20mg/ml).....	28
4.4 PREPARO DE MATERIAL.....	29
4.4.1 Esterilização.....	29
4.4.2 Incubação.....	29
4.5 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS (RAEDER; BRODA, 1985 modificado por GLIENKE, 1995).....	29
4.6 RNA DUPLA FITA.....	30
4.6.1 Identificação da presença de RNA dupla fita.....	30
4.6.2 Cura do RNA dupla fita.....	30
4.7 GERMINAÇÃO DE ESPOROS.....	31
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS COLÔNIAS DE <i>P. spinarum</i> .....	32
5.2 IDENTIFICAÇÃO DO RNAdf.....	33
5.3 CURA DO RNAdf.....	34
5.3.1 Cura do RNAdf com ciclohexamida.....	34
5.3.2 Cura do RNAdf por elevação de temperatura.....	34
5.4. GERMINAÇÃO DE ESPOROS.....	37
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>40</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 1 - FUNGOS FITOPATOGÊNICOS COM RNAdf.....	13
TABELA 2 - HOSPEDEIRO, ANO E LOCAL DE ISOLAMENTO DAS LINHAGENS UTILIZADAS DE <i>Phyllosticta spinarum</i> .....	24
FIGURA 1 - LINHAGENS DE <i>P. spinarum</i> EM MC APÓS 20 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C.....	32
FIGURA 2 - ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DE LINHAGENS DE <i>P. spinarum</i> ....	33
FIGURA 3 - MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DE <i>P. spinarum</i> , APÓS 20 DIAS DE CRESCIMENTO A 37°C.....	35
FIGURA 4 - MORFOLOGIA DA LINHAGEM ECPR8 DE <i>P. spinarum</i> APÓS TRATAMENTO COM TEMPERATURA MODERADAMENTE ELEVADA.....	36
FIGURA 5 - MORFOLOGIA DA LINHAGEM ECPR3 DE <i>P. spinarum</i> APÓS TRATAMENTO COM TEMPERATURA MODERADAMENTE ELEVADA.....	36
FIGURA 6 - MICROSCOPIA DE TUBO GERMINATIVO E APRESSÓRIO DA LINHAGEM ECPR3.....	37
FIGURA 7 - MICROSCOPIA DE TUBO GERMINATIVO E APRESSÓRIO DA LINHAGEM ECPR6.....	38

## RESUMO

Fungos endofíticos têm sido isolados em várias espécies vegetais. Dentre os fungos de isolamento freqüente, destaca-se o gênero *Phyllosticta*, que geralmente corresponde à forma imperfeita do ascomiceto *Guignardia*. Muitos autores fizeram e vêm fazendo pesquisas sobre o RNA dupla fita (RNA<sub>df</sub>) em fungos, e a presença deste RNA<sub>df</sub> é em muitos casos relacionada com alteração fenotípica em seus hospedeiros. Em fungos fitopatogênicos sua presença é geralmente associada como causador de hipovirulência. Outras mudanças morfológicas também ligadas a presença de RNA<sub>df</sub> podem ocorrer com fungos, principalmente alterações nas taxas de crescimento, reprodução e pigmentação. Com o objetivo de caracterizar o RNA dupla fita do fungo *Phyllosticta spinarum*, fungo endofítico de *Citrus limon*, foram utilizadas as linhagens ECPR3, ECPR5, ECPR6, ECPR8 e ECPR10. Inicialmente foram feitas extrações de ácidos nucleicos totais das linhagens para confirmar a presença de RNA<sub>df</sub>. Nas linhagens ECPR3, ECPR5, ECPR8 e ECPR10 foram observadas bandas correspondentes a RNA<sub>df</sub> e apenas na linhagem PR6 não foi encontrado RNA<sub>df</sub>. Para poder avaliar a real influência destes elementos neste fungo, técnicas de cura de RNA<sub>df</sub> foram utilizadas. Primeiramente utilizou-se a ciclohexamida, reconhecidamente eficiente na cura de micovirose. Todas as linhagens foram submetidas ao crescimento em meio completo (MC) com ciclohexamida nas concentrações de 100, 50, 15, 10, 5 e 1 µg/mL, à 28 °C, mas nenhum ponto inoculado se desenvolveu e chegou a formar uma colônia, levando à conclusão que este fungo é muito sensível à ciclohexamida. Devido a estes resultados foi utilizada a técnica de tratamento apenas com a temperatura moderadamente elevada à 37°C, e em todos as linhagens os pontos inoculados se desenvolveram até formar colônias, mas a morfologia observada foi muito diferente das colônias que crescem à 28°C que é a melhor temperatura para o crescimento deste fungo. Após duas gerações nesta temperatura, as linhagens voltaram a ser cultivadas à 28°C e observou-se grande instabilidade nas colônias, que passaram a produzir muitos setores. Alguns destes setores foram isolados e tiveram seus ácidos nucleicos extraídos. Não foi possível confirmar a cura por este método, porém na caracterização dos ácidos nucleicos totais foi verificado um padrão diferente de bandas do RNA<sub>df</sub>. Novas extrações serão necessárias para confirmar se houve ou não cura. Com o objetivo de avaliar possíveis diferenças no padrão de germinação e produção de apressório, bem como a melanização deste, duas linhagens foram investigadas. Foram utilizadas as linhagens PR3 e PR6, respectivamente com e sem RNA<sub>df</sub>. Na germinação em geral não foram observadas diferenças significativas, porém a linhagem PR6, sem RNA<sub>df</sub>, produziu apressórios sem melanina. Outras análises serão necessárias para demonstrar que a presença do vírus está associada positivamente com a produção de melanina neste fungo.

Palavras-chave: Fungo endofítico, *Phyllosticta spinarum*, RNA dupla fita.

## 1 INTRODUÇÃO

A relação entre fungos e plantas é conhecida há muito tempo. Inicialmente, fungos que causam doenças em plantas foram identificados, os fungos fitopatogênicos. Posteriormente, fungos que habitam tecidos vegetais de uma forma assintomática também foram identificados, são os fungos endofíticos, que se diferenciam dos fitopatogênicos, pois aparentemente não causam nenhum dano ao hospedeiro, mesmo se localizando no interior de tecidos vegetais por todo seu ciclo de vida ou parte dele. Considera-se que entre estes fungos e seus hospedeiros existe uma relação mutualística ou simbiótica neutra. Os fungos endofíticos podem ser identificados por exame microscópico do tecido vegetal, pois são geralmente intercelulares, ou podem ser isolados em meios de cultura.

Vários fungos já foram identificados como endofíticos em cerca de três décadas de pesquisas nesta área, incluindo numerosas espécies de ascomicetos e deuteromicetos, alguns basidiomicetos e também poucos representantes dos oomicetos. Alguns destes fungos são, aparentemente, bem adaptados ao modo de vida endofítico e podem ser rotineiramente isolados de vários hospedeiros diferentes. Outros são isolados apenas ocasionalmente e a sua ocorrência como endófitos parece ser secundária com relação a uma outra forma de existência, como o caso de alguns fungos saprófitas.

Dentre os fungos de isolamento freqüente, destaca-se o gênero *Phyllosticta*, que geralmente corresponde à forma imperfeita do ascomiceto *Guignardia*. A separação de espécies em *Phyllosticta* é baseada principalmente no hospedeiro do qual foi isolado e, em menor grau, em características morfológicas dos picnídios, conídios e micélio. Na taxonomia deste fungo, a importância da especificidade com o hospedeiro tem sido superestimada, pois, somente uma pequena fração de fitopatogênicos é realmente específica a um hospedeiro. Assim, existe uma dificuldade muito grande em se classificar isolados deste gênero. Fungos do gênero *Guignardia* vêm sendo associados a várias doenças vegetais, inclusive à Mancha Preta de Citros (MPC). Linhagens deste gênero também vêm sendo isoladas do interior de tecidos de várias espécies de citros

sem a MPC, ou seja, em plantas assintomáticas, sendo então denominadas de endofíticas. Atualmente, com base principalmente em dados obtidos com o uso de marcadores moleculares (RAPD e seqüências ITS), tem se demonstrado que estas linhagens pertencem a diferentes espécies deste gênero. Por outro lado, várias outras espécies de fungos endofíticos já foram relacionadas taxonomicamente a patógenos virulentos do mesmo hospedeiro. O isolamento de fungos endofíticos pertencentes a espécies historicamente patogênicas tem levado ao uso do termo “endofitismo” como sinônimo de latência, presumindo que alterações nas condições microambientais levariam ao surgimento de sintomas, sugerindo assim transições entre os estados endofítico e patogênico. Este pode ser o caso em alguns sistemas planta-microrganismos, mas com certeza não constitui uma regra.

Trabalhos recentes (KAVA-CORDEIRO, 2004; STRINGARI, 2004) com os gêneros *Guignardia* e *Phyllosticta* têm demonstrado que estes fungos não são parasitas ocasionais, e sim aparecem como endofíticos quando estão em hospedeiro não suscetível, geralmente pertencente a outra espécie vegetal.

Muitos autores fizeram e vêm fazendo pesquisas sobre o RNAdf em fungos, e a presença deste RNAdf é em muitos casos relacionada com alteração fenotípica em seus hospedeiros. Geralmente sua presença é associada como causador de hipovirulência em fungos fitopatogênicos, em que o fungo diminui seu poder de virulência. Outras mudanças morfológicas também ligadas a presença de RNAdf podem ocorrer com fungos, principalmente alterações nas taxas de crescimento, reprodução e pigmentação. Em alguns casos, após a cura do RNAdf, são comparados os fenótipos com e sem o RNAdf de uma mesma linhagem, e assim, é compreendida a real influência destas micoviroses.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS E FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Microrganismos capazes de colonizar tecidos internos de um vegetal foram denominados de endofíticos pela primeira vez por De Bary em 1866 (STONE, 1988). CARROLL (1988) restringiu o uso do termo endofítico para organismos que causam colonizações assintomáticas, excluindo deste conceito fungos patogênicos e fungos mutualísticos tais como os fungos micorrízicos. PETRINI (1991) propôs que a definição de Carroll fosse expandida para incluir todos os organismos que fossem capazes de colonizar os tecidos internos dos vegetais, sem causar um dano aparente.

A presença dos endofíticos pode ser demonstrada tanto por exame microscópico do tecido vegetal como também por isolamento em meios de cultivo. Para o isolamento é necessário que o tecido tenha sua superfície esterilizada e então fragmentos deste tecido são colocados em meio de cultura e incubados (MOORE-LANDECKER, 1996). REISSINGER, VILICH e SIKORA (2001) testaram algumas técnicas de esterilização de superfície com plantas axênicas, livres de microrganismos, que tinham sido propositadamente infectadas com duas espécies de *Chaetomium*. Os autores concluíram que algumas técnicas de esterilização de superfície podem prejudicar a detecção de fungos endofíticos que estão dentro da epiderme da planta.

PETRINI (1986) encontrou fungos endofíticos em todas as espécies vegetais estudadas e concluiu que todas as plantas vivas podem, potencialmente, ser hospedeiras destes fungos.

Embora as interações entre vegetais e endofíticos na maioria dos casos ainda seja uma incógnita, em alguns casos foram encontradas interações que levam a um melhor desempenho das plantas (CLAY, 1987). LATCH e CHRISTENSEN (1985) relataram um maior número de ramificações do caule e um aumento da área foliar em gramíneas, infectadas artificialmente com endofíticos. Também já foram observados casos de plantas com maior tolerância ao ataque de

insetos (CARROLL; CARROLL, 1978; CLAY, 1987; CLEMENTE et al., 1990; CARROLL 1988), resistência a doenças e parasitas (WHITE Jr.; COLE, 1985; WHITE Jr.; COLE, 1986; CLARK; MILLER; WHITNEY, 1989; CALHOUN et al., 1992), resistência a nemátodos (WILSON; CLEMENTE; KAISER, 1991) e antiherbivoria pela produção de toxinas (WHITE JR.; COLE, 1985).

Recentemente, RUDGERS, KOSLOW e CLAY (2004) comprovaram que mesmo fungos endofíticos que aparentemente mantinham uma relação simbiótica neutra com seus hospedeiros, na verdade contribuíam significativamente com a dinâmica populacional do seu ecossistema.

Alguns trabalhos de melhoramento em fungos endofíticos já foram descritos ou pelo menos tiveram seu potencial considerado. MURRAY, LATCH e SCOTT (1992) transformaram o fungo endofítico *Acremonium*, isolado de *Lolium perenne*, e após reintrodução do fungo na planta, verificaram a expressão do gene de interesse. Alguns autores também relataram o potencial que fungos endofíticos apresentam para incompatibilizar o desenvolvimento de patógenos (WHITE JR.; COLE, 1985; CLARK; MILLER; WHITNEY, 1989; CALHOUN et al., 1992, ARNOLD et al., 2003).

Outros autores também sugerem a utilização de endofíticos como micoherbicidas no controle de ervas daninhas (CERKAUSKAS, 1988; CLAY, 1989).

A possibilidade de exploração de fungos endofíticos como produtores de metabólitos para diversos fins foi aventada por alguns pesquisadores e comprovada em certos casos. FISHER, ANSON e PETRINI (1984) detectaram atividade antibiótica em 10 dos 24 isolados de fungos endofíticos obtidos de cinco espécies de Ericaceae. Os fungos produziram os metabólitos quando cultivados em culturas líquidas em agitação. Entre os 10 isolados, cinco apresentaram atividades antifúngicas e antibacterianas ao mesmo tempo. FISHER, ANSON e PETRINI (1986) ensaiaram 25 isolados dos hospedeiros *Ulex europeus* e *U. gallii* e encontraram atividade antibiótica em quatro destes isolados. Os isolados de *Coniothyrium* spp apresentaram atividade antibiótica contra uma ampla faixa de bactérias.

Um exemplo de aplicação biotecnológica de um fungo endofítico é o que ocorre com o *Taxomyces andreanae*. Este fungo é isolado de *Taxus brevifolia*, árvore de crescimento lento e de grande importância para a produção de taxol, um promissor agente no tratamento de tumores de mama e ovário. Com uma produtividade bastante baixa pela planta, a descoberta da produção de taxol também pelo fungo abriu novas perspectivas de obtenção desta droga, para uso em tratamentos de tumores (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

Além de fungos, bactérias também são encontradas com frequência colonizando tecidos vegetais sadios. GILLIS et al. (1989) demonstraram a ocorrência de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar, e que estas, por serem fixadoras de nitrogênio, trazem benefícios para a planta. FAHEY (1988) apresentou o primeiro relato de aproveitamento de um organismo endofítico geneticamente modificado com a bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, isolada do xilema de uma planta não cultivada. Esta bactéria foi transformada com o gene da endotoxina delta de *Bacillus thuringiensis* e introduzida em plantas de milho, para o controle da broca do colmo. ARAÚJO et al. (2001) descreveram várias espécies de bactérias e fungos endofíticos isolados de citros relacionando a frequência destes isolados e, por meio de dados obtidos *in vitro*, apresentaram modos de interação destas bactérias com o fungo *Guignardia citricarpa*.

A utilização de plantas transgênicas tem gerado debates no mundo inteiro a respeito dos riscos destas para o meio ambiente e também para o ser humano. Porém, até recentemente, parecia não haver nenhuma preocupação com os microrganismos presentes nestas plantas. AZEVEDO e ARAÚJO (2003) em extensa revisão sobre o tema demonstram que parece ocorrer pouca ou nenhuma consequência para os microrganismos endofíticos o fato de estarem presentes em uma planta transgênica. Neste mesmo trabalho, os autores apresentam dados que mostram pequenas alterações na população de endófitos de *Citrus sinensis* previamente inoculado com uma bactéria geneticamente modificada.

Os modelos de interação fungo endofítico e planta certamente ainda não são totalmente conhecidos, mas vários fatores envolvidos na colonização da planta devem ser comuns com linhagens fitopatogênicas. O sucesso da

penetração na planta hospedeira pela maioria dos fungos, patogênicos ou não, depende da diferenciação do micélio em estruturas especializadas, denominadas de apressórios (KUBO et al., 1996). Algumas espécies de *Colletotrichum*, *Magnaporthe* e *Phyllosticta* produzem apressório complexo e fortemente pigmentado com melanina (SHAW; KUO; HOCH, 1998). Este pigmento media a formação de uma pressão hidrostática essencial para a ação mecânica do apressório (HOWARD; FERRARI, 1989; BOURETT; HOWARD, 1990). O tratamento de conídios com inibidores de síntese de melanina como Triciclazol e Piroquilon, resulta na produção de apressórios não pigmentados e não funcionais, acarretando a incapacidade do fungo penetrar na planta (WOLOSHUK; SISLER, 1982; BELL; WHEELER, 1986; DEAN, 1997).

Diferentes estratégias estão sendo utilizadas para identificar a rota de infecção de fungos fitopatogênicos. MAOR et al. (1998) desenvolveram um protocolo de transformação para o fungo *Cochliobolus heterostrophus*, patogênico de milho, utilizando como marcador o gene GFP ("Green Fluorescent Protein"). Os autores utilizaram uma linhagem de *C. heterostrophus* transformada para infectar uma planta sadia e acompanhar o desenvolvimento da infecção. SOLOMON, TAN e OLIVER (2003) em recente revisão sobre o tema, ressaltaram que o sucesso nas etapas de infecção e colonização por fungos fitopatogênicos depende das habilidades do fungo em utilizar as fontes de nutrientes disponíveis na planta, penetrar nesta planta e também evitar os mecanismos de defesa da planta.

Vários pesquisadores têm se dedicado ao estudo de correlações entre variações na patogenicidade, marcadores moleculares e compatibilidade vegetativa de isolados de espécies fúngicas. WRIGHT et al. (1996) encontraram uma alta correlação entre agrupamentos obtidos com dados de patogenicidade, compatibilidade vegetativa e marcadores RAPD em *Fusarium oxysporum*. Até então, a classificação de *F. oxysporum* em *formae speciales* e raças era feita de acordo com o hospedeiro e o cultivar, respectivamente. Este modelo de classificação ainda é adotado para a maioria dos fungos fitopatogênicos.

BLANCO (1999) identificou um marcador molecular do tipo RAPD exclusivo de linhagens patogênicas de citros do fungo *Guignardia citricarpa*. A banda foi

recuperada do gel, clonada e seqüenciada. Esta seqüência aparentemente não é codificadora e, a partir dela, foi desenhado um par de oligonucleotídeos iniciadores para amplificar esta seqüência por PCR. Desta forma, linhagens de *Guignardia citricarpa* podem ser identificadas e também com a utilização destes oligonucleotídeos iniciadores, existe a possibilidade de um diagnóstico rápido de plantas infectadas com linhagens patogênicas deste fungo, mesmo antes do aparecimento das lesões que caracterizam a doença. Outra consideração importante da autora a respeito da diferenciação de linhagens endofíticas (não patogênicas) e linhagens patogênicas de *Guignardia* spp é baseada em agrupamentos obtidos a partir de dados gerados por RAPD. O fato de linhagens endofíticas isoladas de citros agruparem juntamente com linhagens patogênicas de goiabeira (*G. psidii*) levou à sugestão de que estes endofíticos não são patógenos latentes do hospedeiro de onde foram isolados e sim patógenos de outras espécies vegetais, incapazes de causar doenças no hospedeiro de onde foram isolados.

## 2.2 O GÊNERO *Guignardia* (Viala e Ravaz) E SEU ANAMORFO, *Phyllosticta* (Pers. ex Desm).

O gênero *Guignardia*, descrito em 1892 por Viala e Ravaz, compreende as formas teleomórfas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos imperfeitos geralmente saprófitas ou semiparasitas de folhas (SIVANESAN, 1984).

Diversos autores isolaram espécies de *Phyllosticta* de plantas aparentemente saudáveis, descrevendo-as como endofíticas (CARROLL; CARROLL, 1978; PETRINI, 1986; LEUCHTMANN et al., 1992; GLIENKE, 1995; PENNA, 2000). No entanto existe um grande número de relatos citando este gênero como fitopatogênico de diversas culturas com grande importância econômica como arroz (SUGHA; SINGH; SHARMA, 1986), cana-de-açúcar (PONS, 1990), tabaco (PATEL; PATEL; TILVA, 1988) e eucalipto (CROUS et al., 1993) e também

frutíferas como abacate e tomate (BAKER, 1938), manga e mamão (McMILLAN JR., 1986), uva (IBRAHIM; BAYCA, 1989), e principalmente em citros (McONIE, 1964a, 1964b; HERBERT; GRECH, 1985; JOHNSTON; FULLERTON, 1988).

A separação de espécies em *Phyllosticta* é baseada principalmente no hospedeiro de onde é isolado e, menor importância é dada a características como sintomatologia e estruturas morfológicas (picnídio, conídio e micélio) (VAN DER AA, 1973). Com o avanço das técnicas de biologia molecular, vem sendo possível traçar um perfil mais preciso na caracterização destas espécies e várias classificações estão sendo revistas.

OKANE, NAKAGIRI e ITO (2001) isolaram fungos do gênero *Guignardia* (anamorfo: *Phyllosticta*) de folhas saudáveis de plantas da família Ericaceae. Morfologicamente, o anamorfo *Phyllosticta*, apresentou-se muito semelhante à espécie *P. capitalensis* P. Henn., conhecido como patogênico de orquídeas. Dados de seqüenciamento de regiões ITS1 e ITS2 ("internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA"), incluindo 5,8S rDNA, demonstraram a identidade dos isolados com *P. capitalensis*. Com estes resultados, os autores descreveram o endofítico ascomiceto como a nova espécie *Guignardia endophyllicola* cujo anamorfo correspondente é *Phyllosticta capitalensis*. Previamente descrito apenas como patógeno de orquídeas, este fungo foi comprovadamente identificado como endofítico de plantas da família Ericaceae. Também PANDEY, REDDY e SURYANARAYANAN (2003) caracterizaram linhagens de *Phyllosticta* isoladas de folhas de árvores tropicais por meio de análise de ITS-RFLP e seqüenciamento de regiões ITS e identificaram estes isolados como *P. capitalensis*. Desta forma, comprovam que este fungo, apesar de inicialmente descrito como patógeno de orquídeas, pode ser encontrado como endofítico de várias espécies vegetais.

Em recente trabalho, BAAYEN et al. (2002) compararam dezenas de linhagens patogênicas e endofíticas de *Guignardia* spp, *Phyllosticta* spp e *G. citricarpa* isoladas de diferentes espécies vegetais de diversas regiões da Ásia, África, Austrália e América. Foram utilizados dados morfológicos e também moleculares (seqüências ITS e AFLP). Os dados morfológicos obtidos estão de acordo com os descritos por McONIE (1964a) onde linhagens patogênicas

apresentam crescimento lento em comparação com linhagens endofíticas, que apresentam crescimento mais rápido e fácil produção de peritécio e ascósporos em meio de cultura. Com os dados moleculares foi possível agrupar os isolados estudados em quatro grupos. Os grupos I e II foram os mais numerosos, sendo que no grupo I ficaram os isolados (38 no total) de lesão de citros (mancha preta), com crescimento mais lento e que foram então, identificados como *G. citricarpa*. No grupo II (43 isolados), os dados moleculares apontaram para uma grande identidade destes isolados com o fungo *G. mangiferae*, sendo que estes isolados eram provenientes de citros e também de outras plantas assintomáticas ou com sintomas bem discretos (pequenas manchas). Com base nestes dados, estes isolados foram classificados como *Guignardia mangiferae*. Os grupos III e IV apresentaram apenas um isolado cada e os dados moleculares apontaram para as espécies *Phyllosticta telopeae* e *P. spinarum*, respectivamente. Estes resultados têm uma grande importância econômica, pois a União Européia apresenta leis fitossanitárias específicas para fungos fitopatogênicos de citros. A classificação de linhagens endofíticas mesmo que isoladas de citros como pertencentes a uma espécie não patogênica a citros, é uma informação bastante relevante para exportações de citros, já que estes fungos não seriam enquadrados como fitopatogênicos de citros.

Dados moleculares têm fornecido informações para que vários autores revisem e ajustem a classificação de espécies de *Guignardia* e *Phyllosticta*. Porém, estes dados também vem sendo utilizados para demonstrar o grande grau de variabilidade genética intraespecífica. BLANCO (1999) e CHRISTO (2002), utilizando dados de RAPD observaram esta variabilidade entre linhagens isoladas de lesão de Mancha Preta de Citros (MPC), ou seja, linhagens de *Guignardia citricarpa*. Esta variabilidade também foi relatada para linhagens isoladas em plantas assintomáticas, atualmente descritas como *Guignardia mangiferae* (GLIENKE-BLANCO et al., 2002; CHRISTO, 2002).

Em recente trabalho, RODRIGUES et al. (2004) caracterizaram linhagens de *Guignardia mangiferae* por meio de dados morfológicos, ISSR-PCR ("Inter Single Sequence Repeat Anchored Polymerase Chain Reaction") e seqüências

ITS1-5,8S-ITS2 e traçam um comparativo destes dados com o local de isolamento como também com o hospedeiro de onde as 18 linhagens estudadas foram isoladas. Estes autores não puderam associar a variabilidade encontrada, principalmente com dados morfológicos e de ISSR-PCR, com hospedeiros e localização geográfica. Algumas linhagens de *Guignardia* e *Phyllosticta* isoladas de hospedeiros não relacionados eram mais semelhantes que outras linhagens isoladas de hospedeiros extremamente relacionados. Estes resultados reforçam a necessidade da utilização de outros dados, além do hospedeiro, para definir a nomenclatura destes fungos.

### 2.3 RNA DUPLA FITA EM FUNGOS

RNAs dupla fita (RNA<sub>df</sub>) são comumente encontrados em fungos e podem estar associados a partículas virais (BUCK, 1986). A maioria desses micovírus existe como simples partícula contendo um único RNA<sub>df</sub> em um capsídio protéico composto por polipeptídeos (CASTRO et al., 1999). Outros RNA<sub>df</sub> não são encapsulados e parecem estar associados à membrana do fungo hospedeiro (MARTINS et al., 1999).

A organização desses elementos é complexa. Existem diferenças significativas em tamanho e forma de apresentação do genoma (íntegro ou fragmentado), o que torna necessário vários grupos para acomodá-los (NUSS; KOLTIN, 1990).

Em recente revisão, MERTENS (2004) relatou cinco famílias de vírus de RNA<sub>df</sub> que vem sendo identificadas infectando fungos. São elas:

- Hypoviridae: genoma de um segmento, com vesículas de 50 a 80 nm que não possuem capsídio protéico;
  - Totiviridae: genoma de um segmento e com capsídio icosaédrico de 30 a 40 nm de diâmetro;
  - Chrysoviridae: genoma com quatro segmentos, com capsídio protéico icosaédrico de 30 a 40 nm de diâmetro;
- (estas três famílias são exclusivas de fungos)



- Partitiviridae: genoma com dois segmentos, com capsídio protéico icosaédrico com 30 a 40 nm de diâmetro (hospedeiros de vírus desta família podem ser fungos e plantas);
- Reoviridae: genoma com 10, 11 ou 12 segmentos, empacotados em capsídios protéicos icosaédricos de 70 a 90 nm de diâmetro. Esta é a família mais numerosa de vírus de RNA de fita dupla, sendo que os hospedeiros destes vírus podem pertencer a diferentes táxons, como: fungos, plantas, artrópodos, peixes, répteis, pássaros e mamíferos. Recentemente foi descrito o que deve ser o primeiro caso de um vírus desta família infectando um fungo. OSAKI et al. (2002) relataram a existência de um vírus com 12 bandas, encontrado em uma linhagem hipovirulenta do fungo fitopatogênico *Rosellinia necatrix*.

Os micovírus são regularmente transmitidos através do contato citoplasmático pela fusão de hifas. Partículas virais também podem ser transmitidas para os esporos durante o desenvolvimento do fungo, mas, aparentemente não podem infectar através da parede celular intacta (TIAGO, 2001). Segundo BUCK (1986), os micovírus não têm habilidade de lisar as células do hospedeiro, sendo que o único mecanismo natural de transmissão é o citoplasmático, refletindo em uma gama limitada de hospedeiros, já que fungos filamentosos possuem um sistema de auto-reconhecimento geneticamente regulado que impede a fusão de hifas entre linhagens incompatíveis. Este sistema de incompatibilidade vegetativa, de acordo com McCABE, PFEIFFER e VAN ALFEN (1999), limita a transmissão dos micovírus através da reprodução sexual em populações fúngicas.

A identificação destas bandas extras, correspondentes à RNA dupla fita, é relativamente simples. Deve ser utilizado um protocolo de extração de ácidos nucléicos e posterior visualização destes ácidos nucléicos em gel de agarose. A confirmação da natureza das bandas extras, quando encontradas, geralmente é feita com tratamentos com DNase e RNase. Alguns fungos como o *Uncinula necator*, fitopatogênico e biotrófico obrigatório, exigem adaptações no protocolo convencional conforme descrito por DÉLYE e CORIO-COSTET (1998).

Pesquisas indicam que essas partículas virais estão presentes em, aproximadamente, 30% de todas as espécies de fungos (BUCK, 1986). A Tabela 1 mostra de forma resumida exemplos de fungos fitopatogênicos nos quais foram encontrados RNAdf.

A presença de RNA dupla fita foi detectada por VARGA, KEVEI e VÁGVÖLGYI (1994) em 7% dos isolados da natureza e em 25,49% (13 em 51) dos isolados da coleção *nigri* do gênero *Aspergillus*. Também VARGA et al. (1998), detectaram 5,6% de linhagens infectadas em um total de 178 isolados do mesmo gênero.

Em todos os casos, um polimorfismo natural de RNAdf em fungos tem sido verificado. Em geral, 1 a 8 bandas tem sido detectadas com peso molecular variando de 0,5 a 15kb. GILLINGS, TESORIERO e GUNN (1993) apontam para a importância desse polimorfismo como um conveniente marcador para distinguir entre isolados dentro de uma espécie.

Em extenso estudo com o fungo fitopatogênico *Discula destructiva*, RONG et al. (2001) relataram a existência de RNAdf em quase 80% das 108 linhagens investigadas deste fungo. Estas linhagens foram isoladas de locais bastante distantes geograficamente e as diferenças encontradas nos padrões de bandas sugerem que a diversidade genética do RNAdf de *D. destructiva* é gerada rapidamente e que este fungo pode ser infectado simultaneamente por múltiplas viroses.

TABELA 1 – FUNGOS FITOPATOGÊNICOS COM RNAdf

FUNGO	Nº. DE ISOLADOS COM RNAdf (%)	REFERÊNCIA
<i>Botrytis cinerea</i>	143 em 200 (71,5%)	HOWITT et al., 1995
<i>Chalara elegans</i>	3 (100%)	PUNJA, 1994
<i>Cochliobolus victoriae</i>	Não citado	GHABRIAL, 1994
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	14 (100%)	DALE; MANNERS; IRWIN, 1988
<i>Cryphonectria parasitica</i>	7 em 13 (53,85%)	CELIKER; ONOGUR, 1998
<i>Diaporthe ambigua</i>	1 em 2 (50,00%)	PREISIG et al., 2000
<i>Endothia (=Cryphonectria) parasítica</i>	13 em 28 (46,43%)	DAY et al., 1977
<i>Epichloe festucae</i>	1 em 4 (25,00%)	ZABALGOGEAZCOA et al., 1998
<i>Flammulina velutipes</i>	1 (100%)	MAGAE; HAYASHI, 1999
<i>Fusarium graminearum</i>	13 em 286 (4,54%)	CHU et al., 2002
<i>Fusarium poae</i>	Não citado	COMPEL et al., 1999
<i>Fusarium solani</i>	1 (100%)	NOGAWA et al., 1996
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	Não citado	NUSS; KOLTIN, 1990
<i>Leucostoma</i> sp ( <i>L. persoonii</i> e <i>L. cincta</i> )	2 em 24 (8,33%)	HAMMAR; FULBRIGHT; ADAMS, 1989
<i>Monosporascus cannonballus</i>	60,00%	BATTEN et al., 2000
<i>Nectria radicola</i>	24 em 81 (29,63%)	AHN; LEE, 2001
<i>Ophiostoma (=Ceratocystis) Ulmi</i>	5 em 8 (62,50%)	ROGERS; BUCK; BRASIER, 1986
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Não citado	PFEIFFER et al., 2001
	83,30% - México	
<i>Phytophthora infestans</i>	20,00% - Holanda 2,90% - Peru	NEWHOUSE et al., 1992
<i>Pyricularia oryzae</i>	20 em 29 (68,96%)	HUNST; LATERELL; ROSSI, 1986
<i>Pythium irregulare</i>	33 em 39 (84,61%)	GILLINGS; TESORIERO; GUNN, 1993
<i>Rhizoctonia solani</i> AG (anastomosis group) 3	100%	ROBINSON; DEACON, 2002
<i>Rhizopus</i> sp	5 em 27 (18,52%)	PAPP et al., 2001
<i>Sclerotinia minor</i>	11 em 30 (36,67%)	MELZER; BOLAND, 1996
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	1 em 5 (20,00%)	BOLAND, 1992
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	4 em 31 (12,90%)	STEENKAMP et al., 1998

FONTE: RIBEIRO, 2002

Geralmente RNAs dupla fita são latentes ou crípticos mas, em alguns casos, fenótipos particulares são observados em fungos que contêm esses micovírus (CASTRO et al., 1999). A presença de certos elementos de RNAdf está fortemente correlacionada com alterações na patogenicidade, principalmente hipovirulência (BOLAND, 1992). Todavia, infecções por RNAdf podem, também, alterar a morfologia da colônia e reduzir a taxa de crescimento e esporulação de seus hospedeiros (ELLISTON, 1982).

DAY et al. (1977) verificaram que entre as 13 linhagens com RNAdf do fungo fitopatogênico, *Endothia parasitica*, 9 eram tão patogênicas quanto as linhagens que não possuíam RNAdf, mas as outras exibiram várias anormalidades morfológicas e mostraram-se menos patogênicas. Também em *Endothia parasitica*, segundo ELLISTON (1982) a presença de certos RNAs dupla fita resultaram em redução da virulência.

BOLAND (1992) também cita uma possível associação entre RNAdf e hipovirulência no fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, já que isolados virulentos não apresentaram esses elementos e a transmissão de RNAdf ocorreu associada com o fenótipo de hipovirulência para as linhagens virulentas. Em outro estudo com *S. sclerotiorum*, ZHOU e BOLAND (1999) verificaram que linhagens hipovirulentas (com RNAdf) produziam menor quantidade de massa micelial do que linhagens virulentas (livres de RNAdf) em meio de batata líquido (PDB). Também as linhagens hipovirulentas apresentaram uma menor produção e/ou um atraso na produção de ácido oxálico em comparação com linhagens virulentas, especialmente durante os primeiros dias de cultura (3 a 7 dias). Já para a espécie *Sclerotinia minor*, MELZER e BOLAND (1996) verificaram que a presença de RNAdf não necessariamente induz a hipovirulência, uma vez que alguns isolados virulentos também apresentaram esses elementos. Entretanto, todos os isolados hipovirulentos continham RNAdf.

Comparando linhagens de *Chalara elegans* que continham RNAdf quanto ao crescimento, patogenicidade e sobrevivência no solo, PUNJA (1994) verificou que a presença de múltiplos elementos de RNAdf no fungo estava associada com um aumento na esporulação, alteração da morfologia da colônia e redução no

crescimento e na patogenicidade. Resultados semelhantes foram obtidos por HOWITT et al. (1995) em *Botrytis cinerea*. Estes autores compararam várias linhagens contendo RNAdf com linhagens livres destes elementos e encontraram uma diferença na taxa de crescimento e virulência, sendo menores para o grupo contendo RNAdf. CASTRO et al. (1999) observaram neste mesmo fungo que células infectadas com vírus apresentaram um importante grau de degeneração celular em seu citoplasma, inclusive com o desaparecimento de organelas.

A maioria dos isolados do fungo fitopatogênico *Monosporascus cannonballus* que continha RNAdf, após repetidas transferências em meio de cultura em laboratório, desenvolveu fenótipos degenerativos e mostrou redução na virulência (BATTEN et al., 2000).

CHU et al. (2002) observaram a presença de RNAdf em linhagens de *Fusarium graminearum* e então analisaram com mais detalhes uma destas linhagens, verificando mudanças morfológicas como redução do crescimento, aumento da pigmentação, redução da virulência para trigo e decréscimo na produção de toxinas. Além disso, o RNAdf foi transmitido para uma linhagem livre deste elemento por fusão de hifas e a linhagem receptora adquiriu o vírus associado ao fenótipo da linhagem doadora.

Através da fusão de protoplastos, PFEIFFER et al. (2001) transferiram RNAdf para uma linhagem de *Phaffia rhodozyma* não portadora, e os efeitos desses elementos no valor adaptativo do hospedeiro foram testados por seguidas reproduções sexuais e assexuais. Os resultados não mostraram efeito na taxa de crescimento durante a fase lag e log da reprodução vegetativa, mas o número máximo de células na fase estacionária foi significativamente diferente. No entanto, na reprodução sexual, os resultados foram inconclusivos.

Já em *Sphaeropsis sapinea*, STEENKAMP et al. (1998) identificaram quatro linhagens contendo RNAdf das quais duas apresentaram um crescimento mais lento e outras duas um crescimento mais regular. Estas linhagens foram testadas quanto à virulência, e esta apresentou-se menor nas duas linhagens com crescimento mais lento. Desta forma, a redução da virulência em *S. sapinea* apresentou-se positivamente correlacionada com crescimento mais lento *in vitro*,

sugerindo que a presença de RNAdf pode não estar relacionada a estas características.

ZABALGOGEAZCOA et al. (1998), analisando *Epichloe festucae*, não observaram diferenças com relação à virulência entre linhagens infectadas e não infectadas por RNA dupla fita. PAPP et al. (2001) analisando isolados do gênero *Rhizopus* não observaram diferença fenotípica entre isolados com e sem RNAdf. Após fracionamento dos componentes celulares, estes autores relataram a identificação das bandas de RNAdf no extrato de mitocôndrias, exclusivamente. Porém, estes autores indicam a necessidade de uma investigação mais precisa para concluir sobre a localização intracelular destas partículas virais.

Satélites de certos RNA dupla fita são responsáveis pelo “sistema matador”, que fazem com que seu hospedeiro, como ocorre em *Saccharomyces cerevisiae* (WICKNER, 1992) e *Ustilago maydis* (SHELBOURN; DAY; BUCK, 1988), secretem toxinas. As linhagens matadoras contêm segmentos de RNA dupla fita encapsulados que são responsáveis por informações requeridas para replicação e para a estrutura viral, e também por codificar polipeptídeos tóxicos e provavelmente por um papel na imunidade do fungo para a toxina que ele produz.

Em fungos entomopatogênicos, LEAL et al. (1994) realizaram bioensaios utilizando o fungo *Metarhizium anisopliae* contra o afídio *Myzus persicae* e não detectaram diferenças de virulência entre a linhagem com RNAdf e a linhagem isogênica (sem o RNAdf), ao contrário do que é descrito para a maioria dos fitopatógenos. Também TIAGO (2001) analisou a correlação entre a presença de RNA dupla fita e produção de proteases degradadoras de cutícula, secreção de proteína total e produção de conídios em linhagens isogênicas de *Metarhizium anisopliae* variedade *acridum* (= *Metarhizium flavoviride*) e *Paecilomyces fumosoroseus*. Neste trabalho, não foi encontrada correlação entre os parâmetros analisados com a presença ou ausência de RNA dupla fita, sugerindo que a infecção deve ser latente nesses fungos. Em bioensaio com o inseto *Euchistus heros*, linhagens com e sem RNA dupla fita de *M. anisopliae* apresentaram desempenho semelhante na mortalidade deste inseto (RIBEIRO, 2002). Na espécie *M. flavoviride*, MARTINS et al. (1999) verificaram que linhagens com

RNA<sub>df</sub> não foram associadas com hipovirulência em teste contra o gafanhoto *Rammatocerus schistocercoides*.

Resultados diferentes foram obtidos por FRAZZON et al. (2000). Estes autores analisaram a produção de proteases e quitinases em linhagens de *Metarhizium anisopliae* com e sem RNA dupla fita e verificaram que as linhagens com RNA<sub>df</sub> secretavam estas enzimas em menor quantidade. GIMÉNEZ-PECCI et al. (2002) também observaram que as linhagens de *M. anisopliae* com RNA dupla fita secretavam endoquitinases em menor quantidade que as linhagens sem RNA dupla fita. SANTI et al. (2000) também verificou que as mesmas linhagens com RNA dupla fita investigadas por GIMÉNEZ-PECCI et al. (2002) também foram, em regra geral, menos infectivas contra o carrapato *Boophilus microplus*. Resultados semelhantes foram obtidos por DALZOTO (2004) com o entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Em bioensaio com o percevejo marrom da soja, *Euchistus heros*, uma linhagem com RNA<sub>df</sub> foi menos virulenta que a mesma linhagem curada deste vírus, evidenciando o caráter de hipovirulência deste vírus neste fungo.

BIDOCHKA et al. (2000) analisaram vários isolados de *M. anisopliae* que apresentaram RNA dupla fita de tamanhos similares, após separação eletroforética. Os autores observaram por meio da análise de “Northern blot” que os RNA<sub>df</sub> nem sempre eram homólogos. Os isolados também foram caracterizados por RAPD e compatibilidade vegetativa e observou-se que os RNA<sub>df</sub> homólogos ocorreram preferencialmente em linhagens geneticamente relacionadas. BOGO et al. (1996) relataram a presença de RNA dupla fita e partículas virais em várias linhagens de *M. anisopliae*. Mais recentemente, GIMÉNEZ-PECCI et al. (2002) caracterizaram o RNA dupla fita das linhagens infectadas identificadas por BOGO et al. (1996) e sugeriram que os vírus das linhagens AI e M5, MaV – AI e MaV – M5 respectivamente, são pertencentes à família *Totiviridae* e o vírus da linhagem RJ, o MaV – RJ, pertence à família *Partitiviridae*. Ainda neste mesmo trabalho, os autores evidenciam alterações fenotípicas decorrentes da perda espontânea de alguns fragmentos de RNA dupla fita de alto peso molecular da linhagem RJ de *M. anisopliae*.

Em bioensaio com o fungo *Paecilomyces fumosoroseus*, AZEVEDO et al. (2000) também não encontraram nenhuma diferença estatística entre o isolado com RNA dupla fita e a linhagem isogênica sem o RNAdf, indicando que os RNAs dupla fita não causam hipovirulência neste fungo.

Com relação à organização do genoma desses RNAs dupla fita, NOGAWA et al. (1996) verificaram atividade RNA polimerase dependente de RNA ("RDRP – RNA-dependent RNA polymerase") no micovírus FUSO-V de *Fusarium solani*. COMPEL et al. (1999) purificaram o micovírus – FUPO-1 – da linhagem A-11 de *Fusarium poae* e identificaram dois segmentos, um codificando para uma provável RDRP e o outro codificando para uma provável proteína de capsídeo ("coat protein"). A organização do genoma e certas seqüências de FUPO-1 mostraram similaridade ao vírus 2H de *Atkinsonella hypoxylon* e ao micovírus FUSO-V de *Fusarium solani*, membros da família Partitiviridae. Apesar de não ter sido possível estabelecer uma correlação entre compatibilidade vegetativa e RNA dupla fita, estes autores observaram por meio de hibridizações que em linhagens de *Fusarium poae* com compatibilidade vegetativa, RNAs dupla fita de tamanhos similares sempre eram geneticamente relacionados (muito similares ou homólogos) porém em linhagens que apresentavam incompatibilidade vegetativa, os RNAs dupla fita de tamanhos similares eram homólogos ou não.

PREISIG, WINGFIELD e WINGFIELD (1998) seqüenciaram o RNA dupla fita presente em partículas virais de 35 nm de diâmetro de linhagens do fungo filamentoso *Sphaeropsis sapinea*, encontrando dois fragmentos de 5163pb e 5202pb identicamente organizados, possuindo duas ORFs ("Open Reading Frames") sobrepostas, sendo que a ORF1 codifica para uma proteína de capsídeo e a ORF2 para uma RDRP. STRAUSS, LAKSHMAN e TAVANTZIS (2000) caracterizaram o genoma bisegmentado de RNAdf da linhagem Rhs 717 de *Rhizoctonia solani* e encontraram um segmento maior, de 2.363 bases (RNAdf1), seguido por um segmento menor, de 2.206 bases (RNAdf2). Análises do potencial de codificação mostraram que RNAdf1 pode codificar um polipeptídeo de 730 aminoácidos com massa molecular de 86 kDa, o qual tem significativa homologia com uma provável RDRP das partitiviroses de *Fusarium poae* e *Atkinsonella*



*hypoxylon*. O RNAdf2 pode codificar um polipeptídeo de 683aa com massa molecular de 76 kDa, o qual mostra homologia com uma provável proteína de capsídeo das mesmas viroses.

Após investigar 204 isolados europeus do fungo *Heterobasidion annosum*, patogênico de coníferas, IHRMARK et al. (2001) identificaram oito linhagens apresentando de uma (três linhagens) a duas bandas (cinco linhagens) de RNAdf de tamanho de 1,8 a 2,4kb, utilizando DNA como marcador de peso molecular. Uma linhagem pertencia ao grupo tipo P e as outras sete, ao grupo tipo S de intersterilidade. O RNAdf de uma das linhagens com duas bandas foi parcialmente seqüenciado e a seqüência obtida apresentou grande homologia com várias RDRPs, sendo a maior com a provável RDRP de *Rhizoctonia solani* (partitivírus). Neste estudo também foram incluídas quatro linhagens de *H. araucariae*, porém nenhuma banda extra foi verificada nestas linhagens.

Em recente estudo, CHENG et al. (2003) seqüenciaram completamente o RNAdf de *Coniothyrium minitans* e encontraram duas “ORFs” parcialmente sobrepostas, sendo que uma codifica uma provável RDRP e a outra uma provável proteína de capsídeo. Baseado na organização do genoma e na análise da seqüência, o vírus que infecta esta linhagem de *C. minitans* foi identificado como pertencente à família Totiviridae e foi denominado CmRV (*C. minitans* RNA vírus).

No fungo *Diaporthe ambigua*, a seqüência do genoma do RNAdf – DaRV (*D. ambigua* RNA vírus) – encontrada por PREISIG et al. (2000) foi de 4113pb contendo 53% de GC, com duas ORFs presentes no mesmo sentido. O domínio conservado da RDRP estava presente, no entanto, nenhuma ORF foi verificada codificando para uma proteína de capsídeo. Com estes dados, os autores sugerem que o DaRV não é encapsulado e pode estar associado à membrana da célula uma vez que seis prováveis hélices transmembranas estão presentes na porção N-terminal, a qual deve dirigir e ancorar o complexo viral à membrana. Neste fungo, a presença de RNAdf está associada à hipovirulência. MOLELEKI et al. (2003) conseguiram a transfecção do cDNA do DaRV, clonado no plasmídeo pGEM-T “Easy vector” (Promega), para o fungo *Diaporthe perijuncta* através de eletroporação de esferoplastos. Após a confirmação da existência do vírus neste

fungo, estes autores verificaram que estas linhagens tiveram uma diminuição na taxa de crescimento e aumentaram a produção de micélio aéreo, porém deixaram de produzir ascósporos. Em ensaio com maçã, estes autores também verificaram que a patogenicidade não foi alterada, concluindo então que o DaRV parece não possuir potencial como controle biológico destes fitopatógenos.

Resultados mais favoráveis da utilização de vírus no controle biológico de fungos fitopatogênicos vêm sendo obtidos com os vírus de hipovirulência de *Cryphonectria parasitica*. Este fungo é responsável pelo cancro em castanheiras. Na Europa, esta doença vem sendo controlada pela disseminação de linhagens hipovirulentas (com vírus) e atualmente, lesões de cancro curadas estão sendo encontradas e investigadas. Em todas é confirmada a presença do RNA dupla fita do hipovírus (ROBIN; HEINIGER, 2001). Recentemente, HOEGGER et al. (2003) comprovaram a disseminação dos vírus presentes nas linhagens infectadas em cancos previamente tratados com o fungo infectado com o vírus e também em novas lesões da doença, que não tinham sido tratadas anteriormente.

SASAKI et al. (2002) utilizaram a técnica de biolística para transformação, com o cDNA de CHV1-EP713, vírus responsável pela hipovirulência em *Cryphonectria parasitica*, de fungos da ordem Diaporthales, sendo duas linhagens de *C. parasitica*, uma de *Valsa ceratosperma* e também uma linhagem de *Phomopsis* tipo G. Tanto para os hospedeiros naturais deste vírus como para *V. ceratosperma* e *Phomopsis*, foram observadas uma alteração morfológica e, mais importante, uma redução na virulência destas linhagens.

Embora haja um grande número de relatos sobre RNAs dupla fita em fungos, o significado biológico dessas micoviroses, incluindo sua influência na patogenicidade e/ou influência no fenótipo do hospedeiro, ainda é incerto para a maioria dos casos. Conseqüentemente, estas infecções têm gerado grande interesse e têm se tornado alvo de extensas pesquisas, especialmente em fitopatógenos onde há um grande potencial na utilização de RNAs dupla fita como agentes de controle biológico, utilizando a hipovirulência que estes vírus podem conferir a estes fungos.

## 2.4 CURA DE RNA DUPLA FITA EM FUNGOS

Várias técnicas vêm sendo utilizadas para obter a cura do RNA dupla fita em fungos patogênicos de plantas ou animais.

FULBRIGHT (1984) utilizou ciclohexamida para tentar curar o fungo *Endothia parasitica*, que é patogênico de castanheiras, e obteve a cura da linhagem GHU4 que determinou aumento na virulência e recuperação da morfologia típica da colônia. Segundo STRYER (1988) a ciclohexamida inibe a síntese de proteínas, pois inibe a atividade da peptidil transferase da subunidade 60S do ribossomo, entretanto, um efeito secundário da ciclohexamida é inibir a síntese de RNA, como foi visto na cura de outras espécies (BOTTACIN et al. 1994, ELIAS; COTTY 1996).

Já ROBINSON e DEACON (2001) não obtiveram sucesso na cura total do RNAdf do fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* (AG3) utilizando ciclohexamida nem com incubação prolongada de 8 semanas nem com a técnica de subculturas de pontas de hifas. Apenas elementos menores de RNAdf foram eliminados, enquanto que os maiores ficaram inalterados.

BOLAND (1992) também não obteve a cura do RNAdf em *Sclerotinia sclerotiorum*, utilizando subculturas de pontas de hifas e tratamento das colônias com calor ou ciclohexamida. O autor associou a hipovirulência do fungo com a presença do RNAdf.

Em testes de cura com ciclohexamida ou emetina, AHN e LEE (2001) perceberam que apenas com a eliminação de segmento 6,0 kb de RNAdf em *Nectria radicicola* é que a fisiologia do fungo foi alterada. Ocorreu uma diminuição da virulência, esporulação e pigmentação, desta forma, o segmento 6,0 kb RNAdf é um regulador positivo na fisiologia deste fungo, diferentemente de outros trabalhos em que a presença do RNAdf torna o fungo hipovirulento como foi relatado por outros autores (FULBRIGHT 1984, BOLAND 1992).

Utilizando outra técnica na tentativa de eliminar o RNAdf de *Paecilomyces fumosoroseus*, fungo entomopatogênico, (AZEVEDO et al. 2000) obtiveram a cura em um dos isolados através do isolamento de colônias monospóricas. Este

trabalho mostrou pela primeira vez que fragmentos de RNAdf não causaram efeitos de hipovirulência em *P. fumosoroseus*.

ELIAS e COTTY (1996) tiveram resultados variáveis para três técnicas de cura de RNAdf utilizadas em *Aspergillus sect. flavi*. Com ciclohexamida a cura ocorreu em 40% dos isolados com RNAdf. Usando a técnica de colônia monospórica seqüencial, a freqüência de cura variou de 11 a 100% e com a técnica de clorato para seleção de mutantes para o metabolismo de nitrogênio, a freqüência de cura variou de 0 a 100%. Os autores ainda verificaram que a presença e/ou ausência de RNAdf não está associada à produção de aflotoxina.

### 3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal contribuir para o conhecimento da biologia do fungo *Phyllosticta spinarum* e como objetivos específicos:

- Investigar e caracterizar RNAdf em linhagens de *P. spinarum*;
- Averiguar a influência destes elementos em características morfológicas;
- Desenvolver um protocolo de cura destas micoviroses;
- Caracterizar a germinação de esporos de linhagens com e sem RNAdf.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LINHAGENS UTILIZADAS

Diferentes linhagens de *Phyllosticta spinarum* foram utilizadas conforme discriminado na Tabela 2. Na tabela também estão dados sobre o hospedeiro, o local e o ano de isolamento de cada linhagem.

TABELA 2 – HOSPEDEIRO, ANO E LOCAL DE ISOLAMENTO DAS LINHAGENS UTILIZADAS DE *Phyllosticta spinarum*

LINHAGEM	HOSPEDEIRO	ANO	ISOLAMENTO
ECPR3	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR – Brasil <sup>1</sup>
ECPR5	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR – Brasil <sup>1</sup>
ECPR6	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR – Brasil <sup>1</sup>
ECPR8	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR - Brasil <sup>1</sup>
ECPR10	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR - Brasil <sup>1</sup>

**FONTE:** O autor

NOTA: Linhagens cedidas por: <sup>1</sup> Dra. Chirlei Glienke de Blanco (BLANCO, 1999).

### 4.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS NOS MEIOS DE CULTURA:

#### 4.2.1 Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO et al., 1953)

NaNO <sub>3</sub>	6,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g
ZnSO <sub>4</sub>	0,01 g
Glicose	10,0 g
Água destilada	p/ 1.000 mL

O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1 mol/L. Para MM sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar DIFCO. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

#### 4.2.2 Meio Completo (MC) (PONTECORVO et al., 1953, modificado por AZEVEDO; COSTA, 1973)

Meio Mínimo adicionado de

Extrato de levedura	2,0 g
Peptona	2,0 g
Caseína hidrolizada	1,5 g
Solução de vitaminas	1,0 mL

O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1 mol/L. Para MC sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

#### 4.2.3 Meio Completo (MC) com ciclohexamida

Eventualmente ao MC foi adicionada ciclohexamida. Após a fusão do meio, quando este estava com uma temperatura entre 45 e 50°C recebeu a adição da ciclohexamida em concentrações variadas (100, 50, 15, 10, 5 e 1 µg/mL), logo depois o MC foi homogeneizado para depois então ser plaqueado em placas de Petri.

#### 4.2.4 Meio BDA

Batata descascada e cortada	200 g
Dextrose	20 g
Água destilada	p/ 1.000 mL

A batata foi fervida em água destilada por quinze minutos. Depois de peneirado, a dextrose foi adicionada ao caldo resultante e o volume foi completado

para 1000 mL com água destilada. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1 mol/L. Para meio BDA sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

#### 4.2.5 Solução de Vitaminas

Ácido Nicotínico	100,0 mg
Ácido <i>p</i> -Aminobenzóico	10,0 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Tiamina	50,0 mg
H <sub>2</sub> O destilada esterilizada	p/ 100 mL

A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos e armazenada em frasco escuro, previamente autoclavado, a 4°C.

### 4.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES

#### 4.3.1 Solução Salina

NaCl 0,85% (p/v) em H<sub>2</sub>O destilada.

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

#### 4.3.2 Solução de "Tween 80"

"Tween 80" 0,1% (v/v) em H<sub>2</sub>O destilada.

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

#### 4.3.3 Tampão de Extração de DNA (RAEDER; BRODA, 1985)

Tris-HCl pH 8,0	200 mM
-----------------	--------



NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS (p/v)	1%

A solução foi preparada no momento do uso.

#### 4.3.4 Clorofil

Clorofórmio	24 volumes
Álcool Isoamílico	1 volume

#### 4.3.5 Clorofane

Fenol equilibrado e clorofórmio p.a. na proporção de 1:1.

#### 4.3.6 Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

#### 4.3.7 Tampão TBE 5x (solução estoque)

Tris-base	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
H <sub>2</sub> O destilada	p/ 1000 mL

A solução foi autoclavada e mantida em temperatura ambiente. No momento do uso, foi diluída convenientemente em água destilada.

#### 4.3.8 Solução de Brometo de Etídio

O brometo de etídio foi dissolvido (1,0% p/v) em água destilada. No momento do uso, foram adicionados 3  $\mu$ l em 100 mL de água destilada. A solução foi mantida em temperatura ambiente.

#### 4.3.9 Tampão de corrida ("gel loading buffer")

Sacarose	38%
Azul de bromofenol	1%
EDTA	67 mM

#### 4.3.10 Solução EDTA 0,5 M pH 8,0 (estoque)

O pH desta solução foi ajustado para 8,0 com NaOH 10 mol/L. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

#### 4.3.11 Solução Tris-HCl 1 M pH 8,0 (estoque)

O pH desta solução foi ajustado para 8,0 com HCl 5 mol/L. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C. Ocasionalmente o pH foi ajustado para outros valores.

#### 4.3.12 Solução de Ciclohexamida (20 mg/mL)

Ciclohexamida	0,61g
Acetona	0,5mL
H <sub>2</sub> O MilliQ	30mL

A solução foi esterilizada por filtração. No momento do uso, foi diluída convenientemente.

## 4.4 PREPARO DE MATERIAL

### 4.4.1 Esterilização

Meios de cultura, soluções e palitos de transferência foram esterilizados em autoclave, à pressão de uma atmosfera por 20 minutos.

Vidrarias foram esterilizadas em forno Pasteur a 180°C por 4 horas.

### 4.4.2 Incubação

Linhagens de *P. spinarum*: placas com meio sólido foram incubadas em estufa tipo BOD, a 28°C, por tempo e com luminosidade variados, conforme especificado nas metodologias.

## 4.5 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS TOTAIS (RAEDER; BRODA, 1985 modificado por GLIENKE, 1995)

Fragmentos de micélio foram inoculados em nove pontos, em placas de Petri contendo meio completo sólido (4.2.2). Após 5 a 6 dias de crescimento, as colônias foram retiradas do meio com o auxílio de uma espátula, cuidando para não deixar resíduo de meio de cultura. Os discos de micélio foram colocados em frascos fechados com filme de parafina, congelados e armazenados ou levados ao liofilizador (com o filme de parafina perfurado). Após a liofilização, os frascos foram fechados hermeticamente e armazenados em freezer ou procedeu-se a extração de ácidos nucleicos.

Ao micélio liofilizado, foi adicionado nitrogênio líquido e este foi triturado em gral de porcelana até obtenção de um pó bem fino. Este pó de micélio foi aliquoteado em tubos de 2 mL (40 a 60 mg/tubo) no qual foi acrescentado o tampão de extração (4.3.3), previamente aquecido em banho-maria a 70°C, proporcionando uma suspensão homogênea após agitação suave. Foi incubado por 20 minutos à mesma temperatura. Foi acrescentado um volume de fenol

equilibrado e após a mistura das fases, foi centrifugado a 2.040 g por 15 minutos. A fase aquosa foi coletada, foi acrescentado um volume de clorofane (4.3.5) e centrifugado nas mesmas condições. Após novamente coletar a fase aquosa, foi acrescentado um volume de clorofil (4.3.4), misturado e centrifugado. À fase aquosa, foi acrescentado lentamente um volume de isopropanol, e mantida a solução a -20°C por, no mínimo, 1 hora para precipitação dos ácidos nucleicos. A suspensão foi centrifugada a 11.750 g por 20 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi lavado com etanol 70% (1 mL por tubo) e novamente centrifugado (11.750 g por 5 minutos). Repetiu-se este procedimento e então os tubos foram deixados abertos e invertidos para secagem, a 37°C por uma hora ou durante a noite em temperatura ambiente. Os ácidos nucleicos foram ressuspensos em TE (4.3.6) ou água Milli-Q esterilizada, conforme especificado em cada protocolo.

#### 4.6 RNA DUPLA FITA

##### 4.6.1 Identificação da presença de RNA dupla fita

A verificação da presença de bandas de RNA dupla fita das linhagens de *Phyllosticta spinarum* foi feita por meio de eletroforeses dos ácidos nucleicos totais destes fungos em gel de agarose 1% ou 1,5% em TBE 1x a 4 V/cm. As linhagens que apresentaram bandas extras foram identificadas e foi utilizado como padrão de peso molecular o fago  $\lambda$  clivado com a enzima *HindIII*.

##### 4.6.2 Cura do RNA dupla fita

Todas as linhagens de *P. spinarum* foram repicadas em meio completo (MC) com ciclohexamida (4.2.3) nas concentrações de: 100, 50, 15, 10, 5 e 1  $\mu\text{g/mL}$ . Para cada concentração de ciclohexamida no MC foram feitos repiques em 2 placas, para que uma das placas ficasse em uma estufa à 28°C e a outra em uma estufa à 37°C.

Para a cura do RNAdf, também foi utilizada a técnica de incubação em temperatura moderadamente alta para este fungo (37°C) por algumas gerações. De início, para cada linhagem foi realizado um repique em MC (4.2.2). As placas de Petri ficaram em estufa à 37°C por 20 dias, e a partir das colônias que se desenvolveram, foi realizado mais um repique para obter a 2ª geração à 37°C. Após 20 dias, foi realizado o 3º repique, porém, neste as placas ficaram em estufa à 28°C para obter material para a extração de DNA.

#### 4.7 GERMINAÇÃO DE ESPOROS

Para a obtenção da suspensão de esporos foram feitos repiques das linhagens ECPR3 e ECPR6 para meio BDA (4.2.4). As placas inoculadas permaneceram em estufa à 28°C por 10 dias até que foi realizada uma raspagem da parte superior do micélio com os esporos. Essa raspagem foi feita com uma espátula autoclavada, e o material coletado foi adicionado a um tubo de 15 mL autoclavado que estava previamente preenchido em 1/3 do seu volume com água destilada autoclavada. Depois foi utilizado um bastão de vidro para o rompimento dos picnídios e liberação dos esporos na água.

Para a germinação de esporos, 3 mL da suspensão de esporos foram colocados em cubas plásticas com uma membrana de celofane (1cm<sup>2</sup>) que tinha sido previamente esticada em uma placa com água. O material foi colocado em um recipiente plástico fechado e mantido em estufa à 26°C.

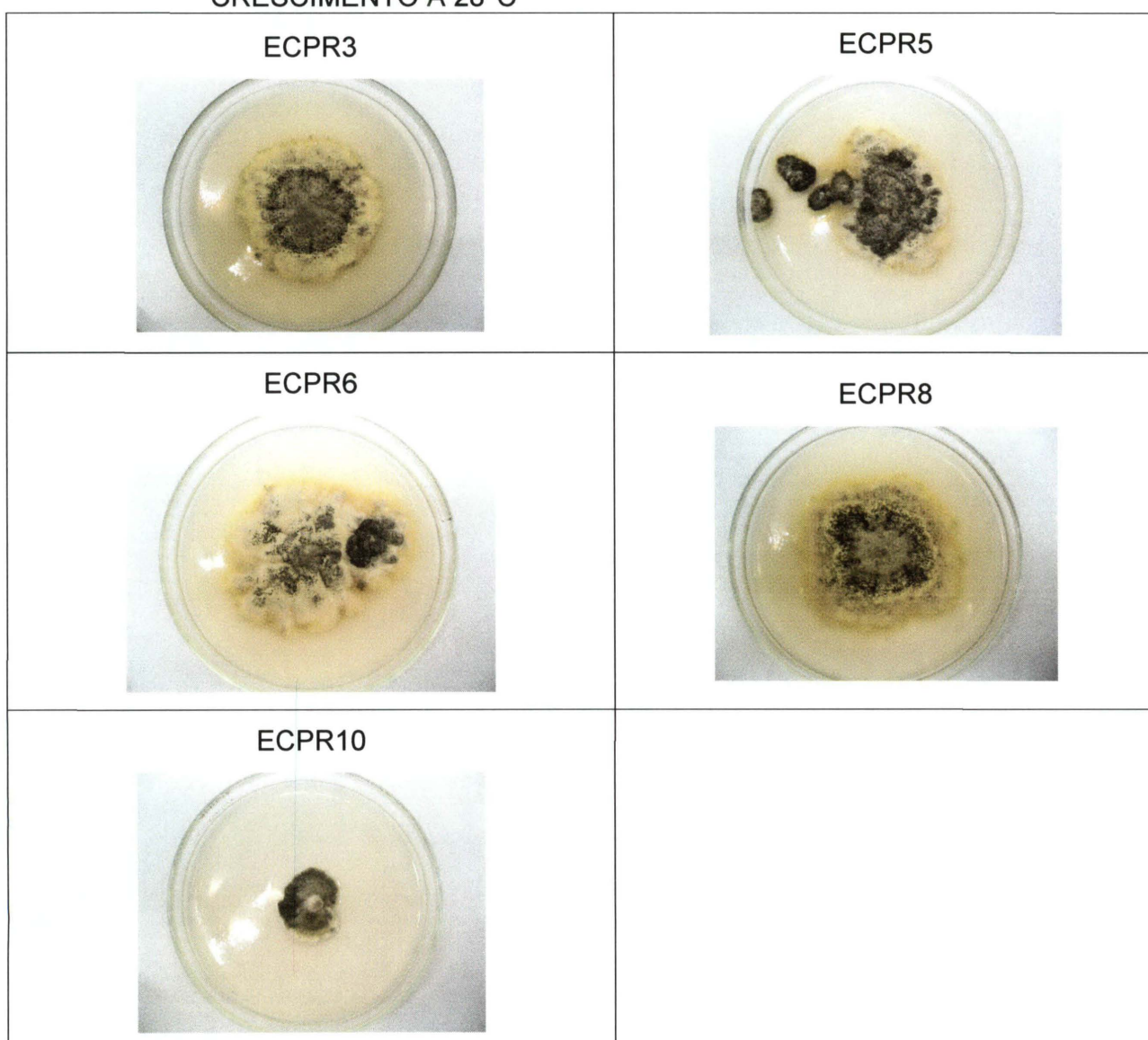
Para a observação da germinação de esporos na membrana de celofane foi utilizado um microscópio Nikon com lentes objetivas de 4, 10, 40 e 100 vezes de aumento. A membrana foi colocada após o tempo desejado (24 e 48 horas) com o auxílio de uma pinça em uma lâmina e foi coberta por uma lamínula. As fotografias da germinação de esporos foram obtidas com o fotomicroscópio Zeiss Axiophot.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS COLÔNIAS DE *P. spinarum*

A morfologia das colônias das linhagens ECPR3, ECPR5, ECPR6, ECPR8 e ECPR10 que cresceram em MC por 20 dias foi observada e registrada fotograficamente (Figura 1). Observa-se que as linhagens apresentam variabilidade na morfologia e tamanho das colônias.

FIGURA 1 – LINHAGENS DE *P. spinarum* EM MC APÓS 20 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C

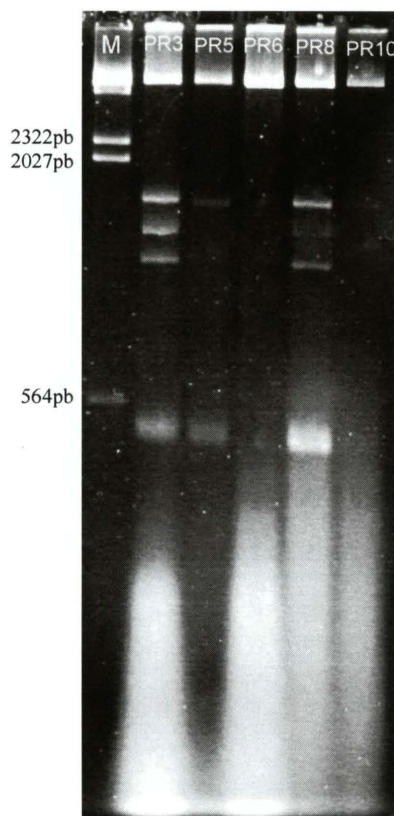


Fonte: o autor

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO DE RNA DUPLA FITA

Para a caracterização do RNAdf nas linhagens de *P. spinarum* foi realizada a extração de ácidos nucleicos totais e posteriormente foi feita uma eletroforese (Figura2).

FIGURA 2 – ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DE LINHAGENS DE *P. spinarum*



Fonte: o autor

Notas: M: marcador de peso molecular fago  $\lambda$ HindIII. Linhagens de *P. spinarum*: ECPR3, ECPR5, ECPR6, ECPR8 e ECPR10.

Nas linhagens ECPR3, ECPR5, ECPR8 e ECPR10 foi caracterizada a presença de RNAdf, com os DNAs bem concentrados e visíveis, com exceção da ECPR10. Mas na ECPR6, mesmo com o DNA bem visível, não observa-se nenhuma banda de RNAdf.



### 5.3 CURA DO RNAdf

#### 5.3.1 Cura do RNAdf com ciclohexamida

Em relação à adição de ciclohexamida ao MC, para todas as concentrações utilizadas (100, 50, 15, 10, 5 e 1  $\mu\text{g/mL}$ ), nenhum dos pontos de repique com micélio se desenvolveu e formou uma nova colônia, tanto na estufa à 28°C quanto na de 37°C. Esta temperatura de 37°C está acima da temperatura ótima de crescimento dos fungos, e foi utilizada para tentar obter a cura do RNAdf com a ação conjunta da ciclohexamida.

Com o auxílio de uma lupa, após dois meses, nas placas de todas as linhagens foram observados alguns pontos com um mínimo crescimento de micélio, e este novo micélio foi repicado para placas contendo MC que foram colocadas na estufa à 28°C. Mas o crescimento do micélio repicado não aconteceu, pois este micélio provavelmente estava muito debilitado devido à ação da ciclohexamida.

Provavelmente o crescimento das linhagens usadas neste trabalho com *P.spinarum* não ocorreu com a utilização de ciclohexamida ao MC, porque este fungo é muito sensível aos efeitos da ciclohexamida. Outros autores utilizaram a mesma concentração de ciclohexamida com outros fungos (FULBRIGHT, 1984; ROBINSON, DEACON, 2001; AHN, LEE, 2001), e os fungos cresceram e até mesmo se curaram do RNAdf. Neste trabalho as linhagens do fungo utilizado não cresceram, conseqüentemente não foi obtida a cura do RNAdf utilizando esta técnica.

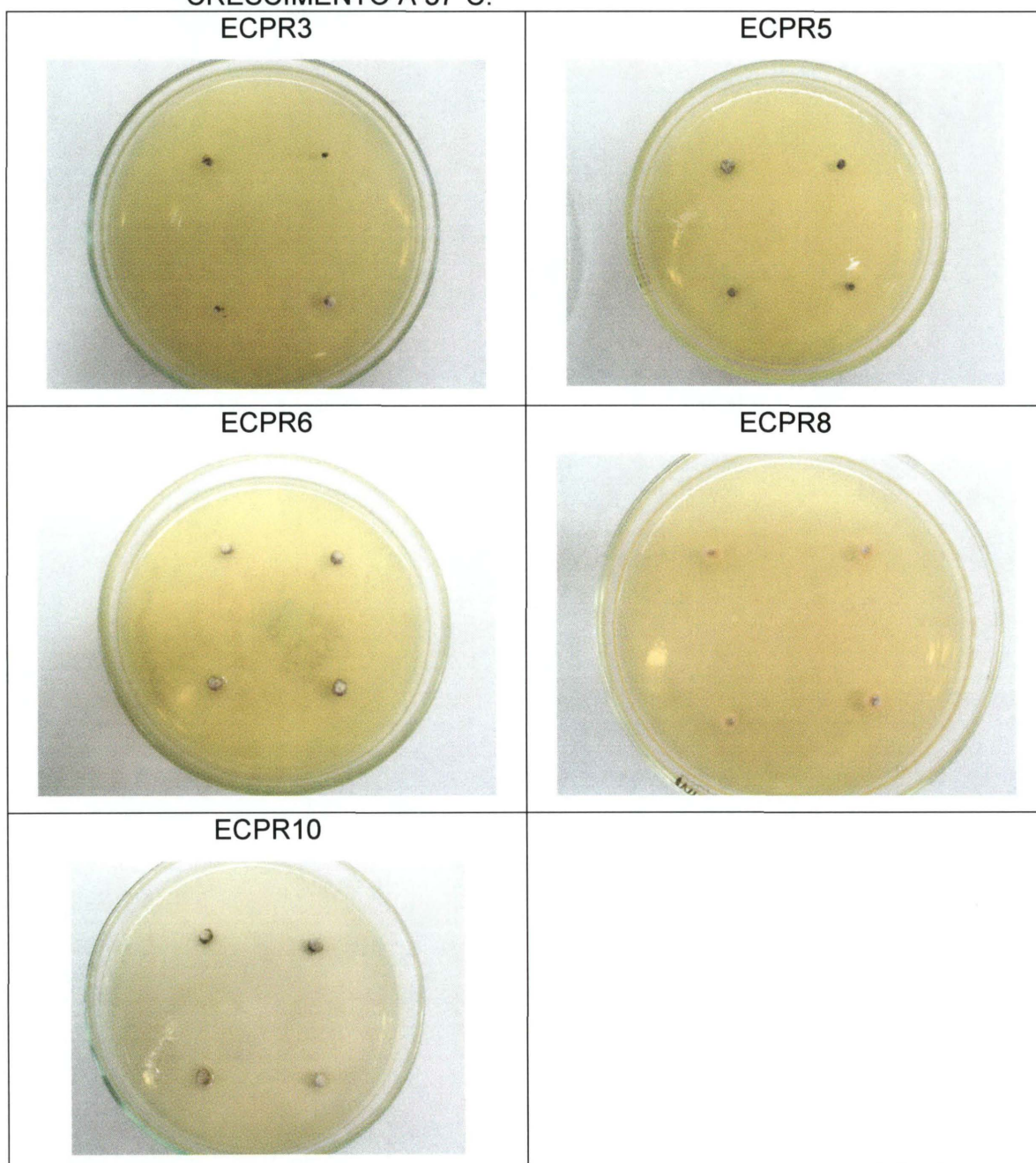
#### 5.3.2 Cura do RNAdf por elevação de temperatura

Devido ao resultado anterior, foi utilizada a técnica de crescimento em temperatura moderadamente elevada na qual as colônias fúngicas cresceram a 37°C por 2 gerações. As colônias de todas as linhagens cresceram, mas de forma



diferente, com a morfologia muito alterada (Figura 3). Mesmo após 20 dias de cultura, as colônias permaneceram pequenas.

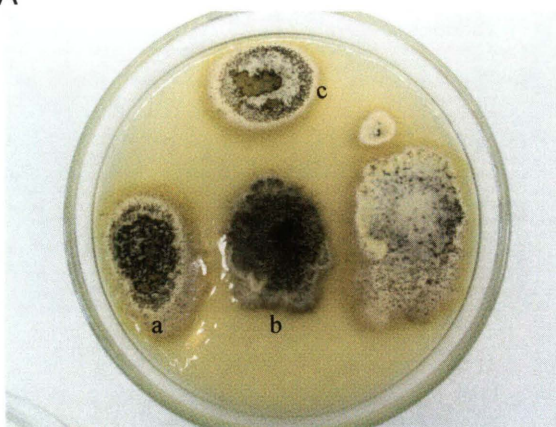
FIGURA 3 – MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DE *P. spinarum*, APÓS 20 DIAS DE CRESCIMENTO A 37°C.



Fonte: o autor

Após duas gerações de 20 dias cada a 37°C, na 3ª geração as placas foram novamente incubadas à 28°C e apenas colônias com repiques realizados com as linhagens ECPR3, ECPR6 e ECPR8 se desenvolveram. A linhagem ECPR8 apresentou-se bastante instável produzindo três morfologias distintas, sendo classificadas como ECPR8a, ECPR8b e ECPR8c (Figura 4). A linhagem ECPR3 também apresentou-se instável, produzindo setores (Figura 5).

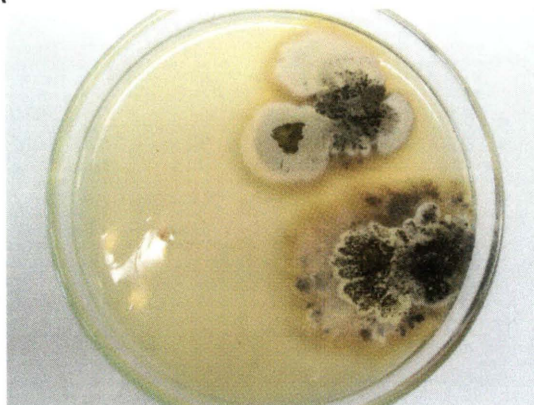
FIGURA 4 – MORFOLOGIA DA LINHAGEM ECPR8 DE *P. spinarum* APÓS TRATAMENTO COM TEMPERATURA MODERADAMENTE ELEVADA



**Fonte:** o autor

Notas: a, b e c: padrões morfológicos distintos da linhagem ECPR8.

FIGURA 5 – MORFOLOGIA DA LINHAGEM ECPR3 DE *P. spinarum* APÓS TRATAMENTO COM TEMPERATURA MODERADAMENTE ELEVADA



**Fonte:** o autor

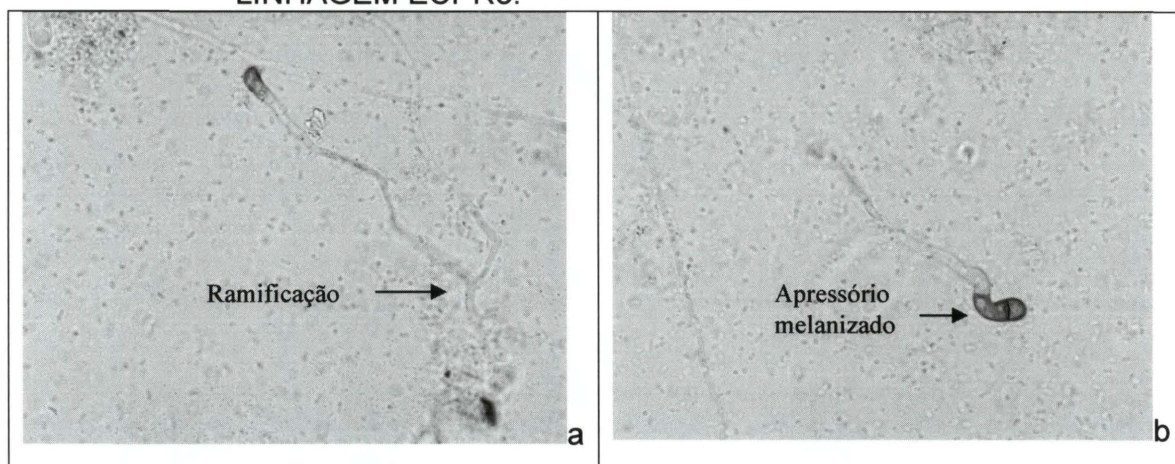


#### 5.4. GERMINAÇÃO DE ESPOROS

A observação da germinação de esporos das linhagens ECPR3 e ECPR6 foi feita com microscopia ótica. Estas linhagens foram escolhidas porque a ECPR3 possui RNAdf e a ECPR6 não, fato evidenciado através da extração de ácidos nucléicos totais e posterior análise por eletroforese. Foi observado através do microscópio e registrado em fotos os padrões de germinação e estruturas da ECPR3 e da ECPR6.

Na linhagem ECPR3, foram observados tubos germinativos ramificados e também vários apressórios septados e melanizados (Figura 6a e 6b).

FIGURA 6 – MICROSCOPIA DE TUBO GERMINATIVO E APRESSÓRIO DA LINHAGEM ECPR3.

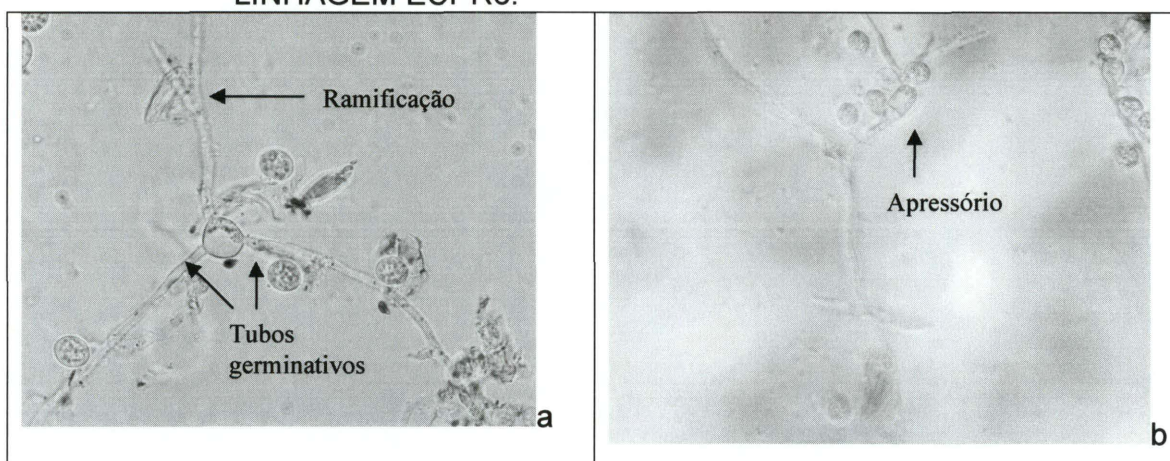


**Fonte:** o autor

**Notas:** a: tubo germinativo ramificado; b: apressório melanizado.

Na linhagem ECPR6, foram observados tubos germinativos ramificados e também apressórios (Figura 7a e 7b).

FIGURA 7 – MICROSCOPIA DE TUBO GERMINATIVO E APRESSÓRIO DA LINHAGEM ECPR6.



**Fonte:** o autor

**Notas:** a: tubo germinativo ramificado; b: apressório.

Comparando o padrão de germinação das linhagens ECPR3 e ECPR6 foi possível constatar que a linhagem ECPR3 produziu mais ramificações nos tubos germinativos do que a linhagem ECPR6. Também foi observado com mais frequência apressórios e estes sempre se apresentaram melanizados. Na linhagem ECPR6, também foram identificados tubos germinativos ramificados, porém com menor ocorrência. Porém, nesta linhagem, mais frequentemente foram observados esporos com mais de um tubo germinativo (Figura 7a). Ainda na ECPR6, raramente foram observados apressórios e estes não se apresentaram melanizados. A pigmentação em fungos, vem sendo associada com a presença ou ausência de RNAdf. Neste caso, estes resultados podem indicar que este fato está também ocorrendo com *Phyllosticta spinarum*, visto que a linhagem ECPR6 não apresenta estes vírus. Novos estudos devem ser feitos com outras linhagens e também com linhagens curadas destes vírus para realmente comprovar esta hipótese.

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- As linhagens ECPR3, ECPR5, ECPR8 e ECPR10 do fungo *P. spinarum* apresentam bandas extras, provavelmente de RNA dupla fita;
- As linhagens utilizadas do fungo *Phyllosticta spinarum* são muito sensíveis à ciclohexamida;
- Protocolos para a cura de micoviroses em *P. spinarum* ainda precisam ser otimizados;
- Há diferenças no padrão de germinação e produção de apressórios entre linhagens de *P. spinarum* que pode ser devida à presença de RNAdf.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, I.P.; LEE, Y.H. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, p. 496-507, april, 2001.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR., W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.

ARNOLD, A.E.; MEJIA, L.C.; KYLLO, D.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E.A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, Washington, v. 100, n. 26, p. 15649-15654, 2003.

AZEVEDO, A.C.S.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H.P. Effects of double-stranded RNA on virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the silverleaf whitefly, *Bemisia tabaci* strain B (homóptera: Aleyrodidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 61-63, 2000.

AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo : EDUSP, 1973. 288 p.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Genetically modified crops: environmental and human health concerns. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 544, p. 223-233, 2003.

BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G.C.; VAN DER AA, H.A.; DE WEERDT, M.; VAN BROUWERSHAVEN, I.R.; SCHUTTE, G.C.; MACCHERONI JR., W.; GLIENKE DE BLANCO, C.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*), **Phytopathology**, St. Paul, v.92, n. 5, p. 464-477, 2002.

BAKER, R.E.D. Studies in the pathogenicity of tropical fungi. II. The occurrence of latent infections indeveloping fruits. **Annals of Botany**, London, v.2, p. 919-931, 1938.

BATTEN, J.S.; SCHOLTHOF, K.B.; MILLER, M.E.; MARTYN, R.D. cDNA probes for detection of specific dsRNAs from the fungal pathogen, *Monosporascus cannonballus*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 84, p. 209-215, 2000.

BELL, A.A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.24, p. 411-451, 1986.

BIDOCHKA, M.J.; MELZER, M.J.; LAVENDER, T.M.; KAMP, A.M.; Genetically related isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* harbour homologous dsRNA virases. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 1094-1097, 2000.

BLANCO, C.G. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise Genética, Cariotípica e Interação com o Hospedeiro**. Piracicaba, 1999. 196p. Tese (doutorado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.

BOGO, M.R.; QUEIROZ, M.V.; SILVA, D.M.; GIMÉNEZ, M.P.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A. Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p.1468-1472, 1996.

BOLAND, G.J. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 14, p. 10-17, 1992.

BOTTACIN, A. M., Levesque, C. A. & Punja, Z. K. (1994) Characterization of dsRNA in *Chalara elegans* and effects on growth and virulence. *Phytopathology* 84: 303-312. In Robinson, Deacon 2001.

BOURETT, T.M.; HOWARD, R.J. *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 68, p. 329-342, 1990.

BUCK, K.W. Fungal virology – An overview. In: **Fungal virology**. Ed. K.W. Buck, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p. 1-84, 1986.

CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklym, v.69, p. 2-9, 1988.

CARROLL, G.C.; CARROLL, F. Studies on the incidence of coniferous endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 5, p. 3034-3043, 1978.

CASTRO, M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; BENAVENTE, J.; CASTILLO, A. A new double-stranded RNA mycovirus from *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 175, p. 95-99, 1999.

CERKAUSKAS, R.F. Latent colonization by *Colletotrichum* spp.: epidemiological considerations and implications for mycoherbicides. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 10, p. 297-310, 1988.

CHENG, J.; JIANG, D.; FU, Y. ; LI, G.; PENG, Y. GHABRIAL, S.A. Molecular characterization of a dsRNA totivirus infecting the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans*. **Virus Research**, Shannon, v. 93, p. 41-50, 2003.

CHRISTO, D. **Variabilidade genética e diferenciação molecular de isolados endofíticos e patogênicos de *Guignardia* spp e *Phyllosticta* sp.** Curitiba, 2002, 78p. Dissertação (Mestrado). Orientadora: Profa. Dra. Chirlei Glienke de Blanco. Universidade Federal do Paraná.

CHU, Y.M.; JEON, J.J.; YEA, S.J.; KIM, Y.H.; YUN, S.H. LEE, Y.W.; KIM, K.H. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2529-2534, 2002.

CLARK, C.L.; MILLER, J.D.; WHITNEY, N.J. Toxicity of conifer needle endophytes to spruce budworm. **Mycological Research**, Cambridge, v. 93, p. 508-512, 1989.

CLAY, K. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. **Oecologia (Berlin)**, Berlin, v.73, p. 358-362, 1987.

CLAY, K. Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as biocontrol agents. **Mycological Research**, Cambridge, v.92, n.1, p. 1-12, 1989.

CLEMENTE, S.L.; PIKE, K.S.; KAISER, W.J.; WILSON, A.D. Resistance of endophyte-infected plants of tall fescue and perennial ryegrass to the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, Manhattan, v.63, n.4, p.646-648, 1990.

CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J.; FERREIRA, F.A.; ALFENAS, A. *Mycosphaerella parkii* and *Phyllosticta eucalyptorum*, two new species from eucalyptus leaves in Brazil. **Mycological Research**, Cambridge, v.97, p. 582-584, 1993.

DALZOTO, P.R. **Parameiose e caracterização de RNAs dupla fita no deuteromiceto *Beauveria bassiana* (Vuill.)**. Curitiba, 2004, 164p. Tese (Doutorado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Universidade Federal do Paraná.

DAY, P.R.; DODDS, J.A.; ELLISTON, J.E.; JAYNES, R.A.; ANAGNOSTAKIS, S.L. Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, p.1393-1396, 1977.

DEAN, R.A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 211-234, 1997.

DÉLYE, C.; CORIO-COSTET, M. F. Rapid isolation of both double-stranded RNA and PCR-suitable DNA from the obligate biotrophic phytopathogenic fungus *Uncinula necator* using a commercially available reagent. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.74, p. 149-153, 1998.

ELLISTON, J.E. Hypovirulence. **Advances in Plant Pathology**, Academic Press, Toronto, Canada, v.1, p.1-33, 1982.



FAHEY, J.W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. In: CUTLER, H.O., ed. **Biologically active natural products: potential use agriculture**. Washington, ACS Symposium Ser., 380, p. 120-128, 1988.

FISHER, P.J.; ANSON, A.E.; PETRINI, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 86, p. 153-156, 1986.

FRAZZON, A.P.G.; VAZ JUNIOR, I.S.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 94, p. 117-125, 2000.

FULBRIGHT, D.W. Effect of elimination dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, p. 722-724, 1984.

GILLINGS, M.R.; TESORIERO, L.A.; GUNN, V. Detection of double-stranded RNA and virus-like particles in Australian isolates of *Pythium irregulare*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 42, p. 6-15, 1993.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R.M.; STEPHEN, M.P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, L.; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. Nov., a nitrogen acetic bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 39, p. 361

GIMENEZ-PECCI, M.P.; BOGO, M.R.; SANTI, L.; KRIGER-DE-MORAES, C.; CORREA, C.T.; HENNING-VAINSTEIN, M.; SCHRANK, A. Characterization of Mycoviruses and Analyses of Chitinase Secretion in the Biocontrol Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, New York. v. 45, n. 5, p. 334-339, 2002.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. Curitiba, 1995, 115p. Dissertação (Mestrado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Universidade Federal do Paraná.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; VIEIRA, M.L.C.; BARROSO, P.A.V.; AZEVEDO, J.L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.25, n.2, p. 251-255, 2002.

HERBERT, J.A.; GRECH, N.M. A strain of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen, resistant to benomyl in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, p. 1007, 1985.

HOEGGER, P.J.; HEINIGER, U.; HOLDENRIEDER, O.; RIGLING, D. Differential transfer and dissemination of hypovirus and nuclear and mitochondrial genomes of a hypovirus-infected *Cryphonectria parasitica* strain after introduction into a natural

population. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.7, p.3767-3771, 2003.

HOWARD, R.J.; FERRARI, M.A. Role of melanin in aplerisorium function. **Experimental Mycology**, Orlando, v.13, p. 403-418, 1989.

HOWITT, R.L.J.; BEEVER, R.E.; PEARSON, M.N.; FORSTER, R.L.S. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Botrytis cinerea*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, p. 1472-1478, 1995.

KAVA-CORDEIRO, V. **Guignardia citricarpa, G. mangiferae e Phyllosticta spinarum: caracterização morfológica, SCARs e RNA dupla fita**. Curitiba, 2004. 131p. Tese (doutorado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Universidade Federal do Paraná.

IBRAHIM, G.; BAYCA, B. Fungal, bacterial and nematological problems of citrus, grape and stone fruits in Arab countries. **Arab Journal of Plant Protection**, Beirut, v.7, n.2, p.190-197, 1989.

IHRMARK, K.; ZHENG, J.; STENSTRÖM, E.; STENLID, J. Presence of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. **Forest Pathology**, Berlin, v.31, p.387-394, 2001.

JOHNSTON, P.R.; FULLERTON, R.A. *Cryptosporiopsis citri* sp. Nov., cause of a citrus leal spot in the Pacific Islands. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, Wellington, v.16, p.159-163, 1988.

KUBO, Y.; TAKAMO, Y.; ENDO, N.; YASUDA, N.; TAJIMA, S.; FURUSAWA, I. Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 12, p. 4340-4344, 1996.

LATCH, C.G.M.; CHRISTENSEN, M.J. Artificial infection of grasses with endophytes. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.107, p. 17-24, 1985.

LEAL, S.C.M.; BERTIOLI, D.J.; BALL, B.V.; BUTT, T.M. Presence of double-stranded RNAs and virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 4, p. 89-94, 1994.

LEUCHTMANN, A.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E.; CARROLL, G.C. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, n. 4, p. 287-294, 1992.

MAOR, R.; PUYESKY, M.; HORWITZ, B.A.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in

*Cochliobolus heterostrophus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 4, p. 491-496, 1998.

MARTINS, M.K.; FURLANETO, M.C.; SOSA-GOMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H. Double-stranded RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. **Current Genetics**, Berlin, v. 36, p. 94-7, 1999.

McCABE, P.M.; PFEIFFER, P.; VAN ALFEN, N.K. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. **Trends in Microbiology**, Limerick, v. 7, p. 377-381, 1999.

McMILLAN JR., R.T. *Guignardia citricarpa* a cause of black spot on mango foliage in Florida. **Journal of Phytopathology (Berlin)**, Berlin, v.117, p. 260-264, 1986.

McONIE, K.C. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, St. Paul, v.54, p.40-43, 1964a.

McONIE, K.C. Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, St. Paul, v.54, p.64-67, 1964b.

MELZER, M.S.; BOLAND, G.J. Transmissible hipovirulence in *Sclerotinia minor*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 18, p. 19-28, 1996.

MERTENS, P. The dsRNA viruses. **Virus Research**, Shannon, v. 101, p. 3-13, 2004.

MOLELEKI, N.; VAN HEERDEN, S.W.; WINGFIELD, M.J.; WINGFIELD, B.D.; PREISIG, O. Transfection of *Diaporthe perijuncta* with *Diaporthe RNA Virus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 3952-3956, 2003.

MURRAY, F.R.; LATCH, G.C.M.; SCOTT, D.B. Surrogate transformation of perennial ryegrass *Lolium perenne* using genetically modified *Acremonium* endophyte. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.233, p.1-9, 1992.

NOGAWA, M.; NAKATANI, A.; GONDA, K.; SHIMOSAKA, M.; OKAZAKI, M. Replication of double-stranded RNA in micovirus from the plant pathogenic fungus *Fusarium solani*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 137, p. 45-49, 1996.

NUSS, D.L.; KOLTIN, Y. Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 37-58, 1990.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Identity of *Guignardia* sp. Inhabiting ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 79, p.101

OSAKI, H.; WEI, C.Z.; ARAKAWA, M.; IWANAMI, T.; NOMURA, K.; MATSUMOTO, N.; OHTSU, Y. Nucleotide sequences of double-strand RNA segments from a

hypovirulent strain of the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*: Possibility of the first member of the *Reoviridae* from fungus. **Virus Genes**, Dordrecht, v. 25, n.1, p.101-107, 2002.

PANDEY, A.K.; REDDY, M.S.; SURYANARAYANAN, T.S. ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.4, p.439-444, 2003.

PAPP, T.; NYILASI, I.; FEKETE, C.; FERENCZY, L.; VAGVOLGYI, C. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Rhizopus* isolates. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 443-447, 2001.

PATEL, B.N.; PATEL, R.C.; TILVA, D.G. *Phyllosticta* leaf spot: a new disease in Bidi tobacco nursey. **Tobacco Research**, Rajahmundry, v.14, p. 1176-1178, 1988.

PENNA, E.B.S. **Microrganismos endofíticos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp por RAPD**. Curitiba, 2000, 123p. Dissertação (Mestrado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Universidade Federal do Paraná.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**, Spring Verlag, 1991, p. 179-197.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. VAN DEN (Eds.), **Microbiology of the Phyllosphere**, Cambridge, U.K. Cambridge University Press, 1986, p. 175-187.

PFEIFFER, I.; LITTER, J.; PÉNZES, Z.S.; KUCSERA, J. Effects of double-stranded RNA viruses on the reproduction of *Phaffia rhodozyma*. **Acta Biologica Hungarica**, Budapest, v. 52, p. 299-306, 2001.

PONS, N. Estudio taxonomico de especies de *Phoma* y *Phyllosticta* sobre caña de azucar (*Saccharum* sp). **Fitopatologia Venezolana**, Maracay, v. 3, p.34-43, 1990.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MaC DONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 5, p. 141

PREISIG, O.; MOLELEKI, N.; SMIT, W.A.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. A novel RNA micovirus in a hipovirulent isolate of the plant pathogen *Diaporthe ambigua*. **Journal of General Virology**, Reading, v. 81, p. 3107-3114, 2000.

PREISIG, O.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Coinfection of a fungal pathogen by two distinct double-stranded RNA viruses. **Virology**, San Diego, v. 252, p. 399-406, 1998.

PUNJA, Z.K. Influence of double-stranded RNA on growth, sporulation,

pathogenicity, and survival of *Chalara elegans*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1001-1009, 1994.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 17-20, 1985.

REISSINGER, A.; VILICH, V.; SIKORA, R.A. Detection of fungi in planta: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 563-566, 2001.

RIBEIRO, J. Z. **Presença, influência e transmissão de RNA dupla fita no fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. 2002. Curitiba, PR. 115p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná.

ROBIN, C.; HEINIGER, U. Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. **Forest Snow and Landscape Research**, v. 76, n. 3, p. 361-367, 2001.

ROBINSON, H.L.; DEACON, J.W. Double-stranded RNA elements in *Rhizoctonia solani* AG3. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 12-22, 2001.

RODRIGUES, K.F.; SIEBER, T.N.; GRÜNIG, C.R.; HOLDENRIEDER, O. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n.1, p. 45-52, 2004.

RONG, R.; RAO, S.; SCOTT, S.W.; TANTER, F.H. Common multiple dsRNA are present in populations of the fungus *Discula destructiva* originating from widely separated geographic locations. **Current Microbiology**, New York, v. 42, p. 144-148, 2001.

RUDGERS, J.A.; KOSLOW, J.M.; CLAY, K. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. **Ecology Letters**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 42-51, 2004.

SANTI, L.; MORAES, C.K.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Existe diferença na infectividade entre as linhagens infectadas ou não infectadas por micovírus? In.: 46º. CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 2000, Águas de Lindóia, **Programas e Resumos**. Águas de Lindóia: SBG, p. 341, 2000.

SASAKI, A.; ONOUE, M.; KANEMATSU, S.; SUZAKI, K.; MIYANISHI, M.; SUZUKI, N.; NUSS, D.L.; YOSHIDA, K. Extending chestnut blight hypovirus host range within Diaporthales by biolistic delivery of viral cDNA. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 15, n. 8, p. 780-789, 2002.

SHAW, B.D.; KUO, K.; HOCH, H.C. Germination and apressorium development of

*Phyllosticta ampellicida* pycnidiospores. **Mycologia**, Lawrence, v.90, n.2, p. 258-268, 1998.

SHELBOURN, S.L.; DAY, P.R.; BUCK, K.W. Relationships and functions of virus double-stranded RNA in a P4 Killer Strain of *Ustilago maydis*. **Journal of General Virology**, Reading, v. 69, p. 975-982, 1988.

SIVANESAM, A. **The bitunicate Ascomycetes and their anamorphus**. J. Cramer., Germany, 1984, 701p.

SOLOMON, P.S.; TAN, K.; OLIVER, R.P. The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 203-210, 2003.

STEENKAMP, E.T.; WINGFIELD, B.D.; SWART, W.J.; WINGFIELD, M.J. Double-stranded RNA and associated virulence in South African isolates of *Sphaeropsis sapinea*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 76, p. 1412-1417, 1998.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, Washington, v. 260, p. 214-216, 1993.

STONE, J.K. Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir, with observations on uninfected epidermal cells. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.66, p. 45-54, 1988.

STRAUSS, E.E.; LAKSHMAN, D.R.; TAVANTZIS, S.M. Molecular characterization of the genome of a partitivirus from the basidiomycete *Rhizoctonia solani*. **Journal of General Virology**, Reading, v.81, p. 549-555, 2000.

STRINGARI, D. **Estudo da variabilidade genética de *Guignardia* spp por meio de marcadores RAPD e seqüências ITS**. Curitiba, 2004, 101p. Dissertação (Mestrado). Orientadora: Profa. Dra. Chirlei Glienke de Blanco. Universidade Federal do Paraná.

STRYER, L. (1988) **Biochemistry**. 3<sup>rd</sup> edn. W. H. Freeman, New York. In Robinson, Deacon, 2001.

SUGHA, S.K.; SINGH, B.M.; SHARMA, B.M. Studies on *Phyllosticta glumarum* causing glume blight of rice (*Oryza sativa* L.) **Himachal Journal of Agricultural Research**, Palampur, v.12, n.1, p. 11-14, 1986.

TIAGO, P.V. **Estudo de proteases degradadoras de cutícula produzidas por *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Paecilomyces fumosoroseus***. Londrina, 2001. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina.

VAN DER AA, H.A. **Studies in *Phyllosticta* I. Studies in Mycology**, n.5, 1973.

VARGA, J.; KEVEI, F.; VÁGVÖLGYI, C. Double-stranded RNA mycoviruses in section *Nigri* of the *Aspergillus* genus. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, p. 325-329, 1994.

VARGA, J.; RINYU, E.; KEVEI, E.; TOTH, B.; KOZAKIEWICZ, Z. Double-stranded RNA mycoviruses in species of *Aspergillus* sections *Circumdati* and *Fumigati*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 569-574, 1998.

WHITE Jr., J.F.; COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. **Mycologia**, Lawrence, v.77, p. 323-327, 1985.

WHITE Jr., J.F.; COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. V. Occurrence of fungal endophytes in certain species of *Bromus* and *Poa*. **Mycologia**, Lawrence, v.78, n.5, p. 846-850, 1986.

WICKNER, R.B. Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 46, p. 347-75, 1992.

WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.218, p.704-740, 1993.

WOLOSHUK, C.P.; SISLER, H.D. Tricyclazole, pyroquilon, tetrachlorophthalide, PCBA, coumarine and related compounds inhibit melanization and epidermal penetration by *Pyricularia oryzae*. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 7, p. 161-166, 1982.

WRIGHT, G. F. K.; GUEST, D. I. ; WIMALAJEEWA, D. L. S.; VAN HEESWIJCK, R. Characterisation of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation in Australia based on pathogenicity, vegetative compatibility and random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 102, p. 451-457, 1996.

ZABALGOGEAZCOA, I.; BENITO, E.P.; CIUDAD, A.G.; CRIADO, B.G.; ESLAVA, A.P.; Double-stranded RNA and virus-like particles in the grass endophyte *Epichloe festucae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 914-918, 1998.

ZHOU, T.; BOLAND, G.J. Mycelial growth and production of oxalic acid by virulent and hypovirulent isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* . **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 21, p. 93-99, 1999.